



**МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ  
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ  
ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



**Др Јелена Вуковић**

**Значај одређивања броја супресорских ћелија  
мијелоидног порекла у крви и микроциркулацији  
тумора код болесника са карциномом плућа**

**Докторска дисертација**

**Ментор: Пк доц. др сци. мед. Слободан Аћимовић**

**Београд, 2021. год.**

*Посвећујем својим родитељима,  
с љубављу и поштовањем*

## Садржај

1. УВОД.....	4
1.1. Иmunска основа тумора.....	8
1.2. Супресорске ћелије мијелоидног порекла.....	12
1.3. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома.....	20
1.4. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома плућа.....	27
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ.....	37
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	39
А. ВРСТА СТУДИЈЕ.....	39
Б. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ.....	39
В. УЗОРКОВАЊЕ.....	40
Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ.....	43
Д. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	45
4. РЕЗУЛТАТИ.....	46
4.1. Заступљеност <i>MDSC</i> у различитим узорцима контролне групе и оболелих пацијената.....	47
4.2. Патохистолошки тип тумора и <i>MDSC</i> .....	52
4.3. Величина тумора и <i>MDSC</i> .....	62
4.4. Нодални статус и <i>MDSC</i> .....	71
4.5. Постојање метастаза и <i>MDSC</i> .....	80
4.6. Клинички стадијум и <i>MDSC</i> .....	89
5. ДИСКУСИЈА.....	98
6. ЗАКЉУЧАК.....	111
7. ЛИТЕРАТУРА.....	113

## 1.Увод

Карцином плућа је, на основу најновијег извештаја Светске здравствене организације, најчешћи малигни тумор (1). У 2018. години он је био узрок смрти код 18,4% пацијената са малигнитетима, а током 2019. године од карцинома плућа умрло је 1.761.007 пацијената широм света (укупан број умрлих од малигнитета је био 9.555.027 пацијената). Такође, у 2018. години, регистровано је укупно 2.093.876 нових случајева карцинома плућа широм света или 11,6% од свих новооболелих пацијената са неким малигнитетом (укупан број новооболелих од малигнитета је био 18.078.957 пацијената).

У односу на пол, карцином плућа је код мушкараца најчешћи новодијагностиковани малигнитет и најчешћи узрок смрти, док је код жена на другом месту, после карцинома дојке, како по броју новооболелих тако и по броју умрлих од малигнитета (2).

Око 85% свих карцинома плућа чини неситноћелијски карцином плућа (енг. *Non-Small Cell Lung Cancer- NSCLC*), а око 15% ситноћелијски карцином плућа (енг. *Small Cell Lung Cancer- SCLC*) (3, 4, 5). Карцином плућа је веома агресиван тумор и око 65% пацијената са *NSCLC* у тренутку постављања дијагнозе већ има локалне, или пак удаљене метастазе (3, 6). Најчешћи патохистолошки типови *NSCLC* су сквамoцелуларни, адено и крупноћелијски карцином плућа (7).

Просечно петогодишње преживљавање пацијената са *NSCLC* креће се у распону од 75% до мање од 5% у Сједињеним Америчким Државама (САД), у зависности од клиничког стадијума болести и од извора података (8, 9). На основу најновијих процена стопа петогодишњег преживљавања од тренутка постављања

дијагнозе код локализоване болести је 57,4%, код регионално узнатредовале болести 30,8%, а код постојања удаљених метастаза 5,2% (8).

Са друге стране, општа стопа петогодишњег преживљавања за особе са *SCLC* износи око 6% (5, 10). Важно је напоменути да стопа преживљавања и код ових пацијената зависи од више фактора, укључујући пре свега стадијум болести. За болеснике са локализованом формом *SCLC*, односно обликом болести где се карцином није проширио изван плућа, укупна стопа петогодишњег преживљавања износи 27%. За регионално узнатредовали облик *SCLC*, стопа петогодишњег преживљавања је 16%, док је за пацијенте који имају удаљене метастазе петогодишње преживљавање свега 3%.

Према подацима Националног института за рак (САД), клинички стадијум карцинома у ком се постави дијагноза одређује могућности лечења, а самим тим има велики утицај на дужину преживљавања пацијената (9). Генерално, ако је карцином локализован, каквих је око 17% дијагностикованих пацијената са карциномом плућа, стопа петогодишњег преживљавања је висока 59%. Код пацијената са регионалним проширењем тумора (22% од свих дијагностикованих случајева са карциномом плућа) преживљавање је 31,7%, док је код пацијената са удаљеним метастазама 5,8% (више од пола дијагностикованих, односно 57% од свих новодијагностикованих пацијената са карциномом плућа). Иако су ови подаци веома забрињавајући, у САД је показано да последњих десет година постоји тренд смањења броја новодијагностикованих пацијената са карциномом плућа, али и броја умрлих, тако да се петогодишња стопа преживљавања поправља последњих година, захваљујући ранијем постављању дијагнозе и све бољој и савременијој терапији. Међутим, смртност је и даље висока. Такође је показано да се највећи број новооболелих од карцинома плућа дијагностикује након 45 година старости, а највећи пик се бележи у

распону од 65. до 74. године живота, чак 34,1% од свих новооболелих (9). Стопе истог тренда односе се и на број умрлих од карцинома плућа, тако да је 32,2% умрлих такође из исте добне групе, од 65. до 74. године старости.

Епидемиолошки подаци за карцином плућа указују на то да се ради о веома агресивном малигнитету. Карцином плућа има значајан утицај и на квалитет живота и на радну способност оболелих (11). Због тога карцином плућа захтева брзо постављање дијагнозе, како би оболели одмах започели са адекватном терапијом, што зависи од фазе болести, хистопатолошког типа тумора, налаза *imaging* метода и туморских маркера, генских анализа и имунских тестова. На основу свега прописује се адекватна терапија која представља комбинацију хируршког лечења, зрачне терапије и/или хемиотерапије, биолошке и циљане терапије у зависности од клиничког стадијума болести (11) и општег стања пацијента (енг. *Eastern Cooperative Oncology Group - ECOG* - статус пацијента) (12, 13).

Стадијум болести одређује се према *TNM* класификацији (енг. *T-primary tumor, N-regional lymph nodes, M-distant metastasis - TNM*) (11). Око 25-40% карцинома плућа су ресектабилни у тренутку постављања дијагнозе, а свега 20% од њих има ограничену болест у време када се подвргавају хируршком лечењу. Зато је важно да се дијагноза постави док је карцином плућа још увек ограничен на једно плуће и ресектабилан, како би се болест могла хируршки лечити. Када настану метастазе, регионалне или удаљене, лечење је далеко теже, неизвесније и најчешће са лошом прогнозом.

Генерално, код пацијената са карциномом плућа, јављају се најпре локалне манифестације болести у зависности од локализације тумора, или су повезане са регионалним или удаљеним метастазама (14). Може се јавити и паранеоплазматски синдром са кардиоваскуларним, неуромускуларним, гастроинтестиналним,

хематолошким, дерматолошким и метаболичким манифестацијама, нефритичким синдромом, грозницом и хипертрофичном пулмоналном остеоартропатијом. Симптоми болести зависе од локализације, величине тумора, постојања метастаза и системских манифестација због паранеоплазматског синдрома. Код централно локализованих тумора јављају се најчешће диспнеја, кашаљ и отежано дисање опструктивног типа, хемоптизије, визинг или стридор, бол у грудима, као и фебрилност код постопструктивног пнеумонитиса. Код тумора периферне локализације најчешће се јавља кашаљ, диспнеја рестрикцијског типа, болови, хемоптизије, плеурални излив и стварање туморских каверни услед некрозе. Код интраторакалног екстензивног раста тумора могућ је настанак *Pancoast* тумора или *superior sulcus* тумора, синдрома опструкције горње шупље вене, парализе рекурентног нерва, захватања плућне марамице и дијафрагме, зида грудног коша, перикарда и срца, као и једњака. Када је реч о паранеоплазматским синдромима, они настају као последица стварања полипептидних хормона, цитокина, амина, хормонима сличних супстанци, имунокомплекса, антитела и других имуномодулатора од стране карцинома плућа, па се испољавају у облику ендокринолошких, неуролошких, кожних, хематолошких и бубрежних манифестација (14, 15, 16).

Код онколошких пацијената данас се примењује концепт персонализоване медицине у терапији (17). Терапијска опција лечења пацијената са карциномом зависи пре свега од клиничког стадијума болести (18), која се темељи на патохистолошком типу тумора, анатомској проширености и општем клиничком стању пацијената. Уз хируршку терапију, у лечењу пацијената са карциномом плућа у I, II и IIIA клиничком стадијуму болести, користи се и допунска зрачна и цитостатска терапија (11, 19). У крајњим стадијумима болести када је тумор

нересектабилан (III и IV *TNM* стадијуми), пацијентима се може дати индукциона хемиотерапија како би се евентуално, ако је тумор сензитиван на примењену терапију, смањила туморска маса и пацијент превео у нижи стадијум болести у коме би се могло применити хируршко лечење (20). Тумори у лумену ваздушних путева могу бити третирани фотодинамичком терапијом. У новије време лечење се све више фокусира на примену биолошке и циљане терапије (21).

### **1.1. Иmunска основа тумора**

Активна интеракција тумора и имунског окружења домаћина је веома значајна за објашњење имунских основа тумора и раста тумора (22). Током свог развоја тумор стиче различите генетске промене и последичну експресију продуката својих гена. Ови продукти су специфични протеини и потенцијални су туморски антигени које имунски систем домаћина треба да препозна као стране антигене. Због тога је једно од кључних питања како имунски систем препознаје ове антигене: или специјално, тако да га они активирају, или тако што постаје толерантан према њима као према антигенима властитог ткива. Већина тумора покреће слабу или никакву реакцију одбацивања код људи (већина је слабо имуногена). Као потврда значаја имунског надзора за обуздавање тумора јесте велика учесталост тумора код имуносупримираних/имунодефицичних особа (23). Да би тумори преживели у домаћину, они морају развити активне механизме који им омогућавају инвазију ткива без активације имунских одговора који би разорили туморско ткиво (22). Стога је прекид имунске толеранције централни циљ активне имунолошке терапије тумора.



Иако тумори настају од нормалног ткива, а самим тим и задржавају његове основне морфолошке и функционалне карактеристике, они се значајно разликују од својих нормалних претеча у биолошком понашању. Основне одлике малигних тумора су: неконтролисани раст и размножавање ћелија, изостанак одговора на регулаторне сигнале одговорне за нормалан раст и опоравак оштећења ткива, инвазиван раст и прелазак баријера нормалних ткива, а самим тим и метастазирање путем лимфе и крвотока у удаљене органе (22). За овакво понашање одговорна је генетска нестабилност туморских ћелија, будући да се током туморогенезе непрекидно дешавају мутације, синтеза нових молекула и концентрација мутираних протеина која се стално повећава (22).

При малигној трансформацији настају промене генетског састава туморских ћелија настанком нових гена типичних за одређени тумор, тј. онкогена (22). Новонастали протеински молекули у туморској ћелији, када су лоцирани на површини ћелијске мембране, представљају тумор специфичне антигене јер могу индуковати хуморални или целуларни имунски одговор. Ови протеини, лоцирани на ћелијској мембрани, представљају специфичне рецепторе за факторе раста и прогресије тумора, који, када се вежу за ове факторе (нпр. фактор епителног раста-*EGF*), покрећу интрацелуларне механизме тј. репликацију ћелијског генома, односно раст и прогресију тумора.

Као што је претходно истакнуто, основна молекулска одлика карцинома јесте генетска нестабилност, па се у тумору његовим растом и прогресијом болести континуирано генеришу нови антигени и мења се антигени профил туморских ћелија (22). Друга биолошка особина туморских ћелија огледа се у томе што оне прелазе баријере нормалних ткива и метастазирају, а самим тим мењају архитектуру ткива. На ћелијском нивоу, нормална ћелијско-ћелијска адхезија и интеракција ћелије и

ткивног матрикса се кида, што даје проинфламаторне сигнале у форми цитокина и хемокина, који су кључни иницијатори имунског одговора. За разлику од нормалних ткива, карциноми су током инвазије и метастазирања стално конфронтирани са инфламаторним одговором. На који начин тумори модулирају тај одговор, зависи од њиховог међуделовања са домаћиновим имунским системом. За успешан развој тумора потребно је да они развију механизме којим ће избећи имунски надзор домаћина. Механизам туморске резистенције један је од видова избегавања имунског система домаћина, али није потврђено да промене у процесуирању нових гена туморске ћелије, или експресија инхибиторних молекула имунског система, представљају одговор тумора на активирани антитуморски имунитет. Други важан механизам за претпостављену имунску резистенцију тумора јесте експресија молекула на површини туморске ћелије, који инхибирају ефекторе имунског одговора. И даље се не зна довољно о туморским механизмима избегавања имунског система домаћина. Стога се сматра да клинички унапредовали тумори вероватно имају развијене активне механизме који резултују толеранцијом.

Антитуморски имунски одговор је често неефикасан јер тумори расту веома брзо, због чега раст тумора једноставно надмаши имунски одговор. Имунски одговор против тумора може бити слаб јер су многи туморски антигени веома слабо имуногени, будући да се врло мало разликују од сопствених антигена.

Избегавање је могуће зато што неки тумори престају да експримирају антигене који су мета напада имунског система (24). Уколико изгубљени антиген није укључен у одржавање малигних особина тумора, такви типови туморских ћелија настављају да расту и да се шире. Други тумори пак престају да исказују *MHC* молекуле па не могу да приказују антигене *CD8+* Т ћелијама. Пошто *NK* ћелије препознају ћелије којима недостају *MHC I* молекули, оне могу да убију само туморе

који не експримирају ове молекуле. Сами тумори такође могу да производе молекуле који супримирају имунски одговор (нпр. фактор трансформације раста бета  $TGF-\beta$ ).

Промене у онкогенима и тумор супресорским генима и/или епигенетске промене доводе до прогресије тумора и локалне инвазије ткива која узрокује перзистентну инфламаторну ћелијску туморску инфилтрацију (25). Тумор узрокује да ћелијски инфилтрата одржавају на тај начин поремећену регулацију инфламације, која имунолошки не реагује на туморско ткиво. Анализа и идентификација интеракција између инфилтрата и тумора може помоћи у дизајнирању специфичних персонализованих антитуморских третмана репрограмирањем туморске микрооколине.

Значајан удео инфламаторног целуларног туморског инфилтрата чине супресорске ћелије мијелоидног порекла (енг. *myeloid-derived suppressor cells-MDSC*), које одржавају имуносупресивно окружење, подржавајући ширење тумора у околно ткиво и на удаљена места преко олакшане ангиогенезе и метастазирања (25). Интеракција између туморских ћелија и имунорегулаторних ћелија домаћина у стварању микроокружења које поспешује прогресију тумора налази се у жижи бројних истраживања последњих година (26). Супресорске ћелије мијелоидног порекла представљају хетерогену популацију незрелих дендритичних ћелија, макрофага и гранулоцита. Код болесника са тумором ове ћелије акумулирају се у туморском микроокружењу, дренажним лимфним чворовима, периферној крви и јетри, а њихов број корелира са стадијумом болести и метастатском болешћу (26).

Карцином плућа управо избегава надзор имунског система домаћина посредством ремећења процеса инфламације, односно дисрегулацијом инфламације (25). У избегавању имунске деструкције туморских ћелија, претпоставља се да развој периферне толеранције игра кључну улогу (27). Активација и регулација

специфичних Т лимфоцита је под контролом антиген презентујућих ћелија (*APC*) и регулаторних Т лимфоцита (*Treg*), а улога регулаторних Т лимфоцита у супресији антитуморског имунског одговора одавно је позната. Међутим, поред регулаторних Т лимфоцита, сматра се да су *MDSC* важан фактор имуносупресије у многим туморима (27).

Од нормалних хематопоеетских стем ћелија у костној сржи настају дендритичне ћелије, макрофаги и гранулоцити услед мијелоидне активације као одговор на вирусе и бактерије, а ове новоформиране ћелије доводе до фагоцитозе, респираторне експлозије и ослобађања проинфламаторних цитокина (28). Такође треба имати у виду да је развој *MDSC* под контролом сложеног система сигнала подељених у две групе: сигнали који промовишу акумулацију незрих мијелоидних ћелија и сигнали који промовишу патолошку активацију ових ћелија. Патолошка активација је резултат трајне стимулације мијелоидног одељка сигнаlima релативно слабог интензитета пореклом од тумора. Активирани *MDSC* се карактеришу релативно лошом фагоцитном активношћу и континуираном производњом реактивних кисеоничних врста, азот-оксида и антиинфламаторних цитокина.

## **1.2. Супресорске ћелије мијелоидног порекла**

*MDSC* представљају хетерогену популацију незрих мијелоидних ћелија које се састоје од мијелоидних прогенитора и прекурсора дендритичних ћелија (*DC*), макрофага и гранулоцита. Ове ћелије настају у костној сржи од заједничких мијелоидних прогениторских ћелија (28). Оне имају способност да инхибирају различите функције Т лимфоцита (29). Код мишева су идентификоване помоћу *CD11b+*, *IL-4Ra+* и *Gr1+* експресије (25, 26). Међутим, ова ћелијска популација је

слабије дефинисана код људи, али генерално су *MDSC* мијелоидног порекла (*CD33+*), *CD11b+*, супримирајуће и са слабом антиген презентујућом функцијом (*HLA-DR-/low*) (26). Код здравих људи ове ћелије су ретке или одсутне у потпуности, али под одређеним околностима (какве су нпр. траума, сепса) могу се нагомилати у циљу ублажавања имунског одговора.

Код пацијената са карциномима њихов број је у корелацији са стадијумом болести и метастатском болешћу (30). Како је утицај *MDSC* на антитуморски имунски одговор значајан, ове ћелије су одлична мета за антитуморско дејство стимулацијом диференцијације *MDSC* у зрели несупресивни фенотип, смањењем броја *MDSC* и инхибицијом супресије антитуморске имуности (31, 32, 33).

Сматра се такође да *MDSC* имају значајну улогу не само у избегавању имунског одговора, већ и у туморској прогресији и метастазирању кроз утицај на туморску микрооколину (34), као и кроз генерисање реактивних кисеоничних врста (*ROS*), удружених са слободним радикалима и имунорегулаторним цитокинима који супримирају *CD4+* и *CD8+* Т ћелијске одговоре (35, 36).

На основу морфологије и испољавања специфичних мембранских маркера (*Ly6C* и *Ly6G* унутар *Gr1* ћелија) *MDSC* се деле у два подтипа: гранулоцитне и моноцитне *MDSC* (37). Ћелије *CD11b+* *Ly6G+* *Ly6Clo* са мултилобулираним једрима и морфологијом сличном гранулоцитима се називају гранулоцитним *MDSC*, а ћелије *CD11b+* *Ly6G-* *Ly6Chi* називају се моноцитним *MDSC* (38). Код људи, *MDSC* су идентификоване преко површинске експресије *CD33+* и недостатка експресије маркера зрелих мијелоидних и лимфоидних ћелија. Оне су типично *CD11b+*, *CD33+*, *CD34+* и *CD14-* и варирају у експресији *CD15*, *CD124*, *CD66* и експресији главног комплекса хистокомпатибилности класе II (*MHC II*) (39). *MDSC* *CD11b+*, *CD14-*, *CD15+* и *CD33+* фенотипа су описане код пацијената са узнапредовалим

неситноћелијским карциномом плућа (40, 41). Будући да експресија гена *MDSC* варира у различитим врстама тумора, идентификација јединственог скупа маркера за хумани *MDSC* је и даље веома изазовна.

Нагомилавање, експанзија и активација *MDSC* у тумору зависе од тумор или строма-зависних фактора раста, цитокина и хемокина (42, 43). Ови укључују простагландин *E2* (*PGE2*), матрикс металопротеиназе, трансформишући фактор раста бета (*TGF-β*), интерлеукин 10 (*IL-10*), васкуларни ендотелијални фактор раста (*VEGF*), интерлеукин-1 бета (*IL-1β*), *IL-4*, гранулоцитно-макрофагни фактор стимулисања колоније (*GM-CSF*), *IL-6*, *IL-13*, *S100A8/A9*, стем ћелијски фактор, *CCL2*, *CXCL5*, *CXCL12*, агонисте *toll-like* рецептора и *HSP72* (*Heat Shock Protein 72*) кога ствара тумор. *GM-CSF* подржава преживљавање и експанзију *MDSC* у туморској микросредини. Извори *GM-CSF* укључују туморе и активирани имунски ефектори као што су Т ћелије, ћелије „природне убице“ (*Natural killer* или *NK* ћелије) и дендритичне ћелије (42, 43).

*MDSC* показују контролу одговора Т лимфоцита путем два ензима - аргиназе 1 (*ARG 1*) која смањује *L*-аргинин и индуцибилне азот оксид синтазе 2 (*iNOS*) која ствара азот оксид (44). Активност *ARG 1* у *MDSC* код пацијената са карциномом је регулисана преко сигналног трансдуктора и активатора транскрипције 3 (*STAT3*) (45). *TGF-β* и *IL-10* индукују *MDSC ARG1*, која сузбија *CD4* и *CD8* Т-ћелијску активацију. Интерферон гама (*IFN-γ*) и фактор некрозе тумора-алфа (*TNF-α*) делују на *MDSC iNOS*, која ослобађа азот оксид и изазива апоптозу Т ћелија (46). *MDSC* такође смањују ниво цистеина, есенцијалне аминокиселине важне за активацију Т ћелија (47).

Ослобађање реактивних кисеоничких врста и пероксинитрита из *MDSC* инхибира функције *CD8+* ћелије катализом нитрације рецептора, спречавајући

интеракције Т-ћелијски-рецептор пептид-*MHC* (48). *MDSC* такође снижавају ниво зета ланца повезаног са Т-ћелијским рецептором (49). *MDSC* директно индукују настанак Т регулаторних ћелија путем производње *IL-10*, *TGF-β*, или *ARG1*, које активно снижавају активацију и експанзију антитумор реактивних Т (50) и *NK* ћелија (51). *MDSC* поларизују Т ћелије према фенотипу типа 2 (*Th2*) и делују имunosупресивно синтезом *IL-10* и снижавањем макрофагне продукције *IL-12* (52).

Показано је да специфични Т лимфоцити не реагују на туморске антигене, што указује на рани догађај у прогресији тумора (53). Диференцијација мијелоидних прекурсора у гранулоците, макрофаге и дендритичне ћелије често је нарушена у тумору (54), што доводи до акумулације *MDSC*. Незреле дендритичне ћелије имају слабу, или немају уопште, експресију костимулаторних молекула (*CD80*, *CD86* и *CD40*) и измењену продукцију *IL-12*. *MDSC* такође негативно регулишу функције *NK* ћелија спречавањем њиховог цитотоксичног дејства и производње интерферона  $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) (55).

Смањење *MDSC* репрограмира туморску нишу мењајући инфламаторне одговоре, дозвољавајући имунодеструкцију тумора и стварање имунске меморије. *MDSC* смањење доводи до повећања *IFN- $\gamma$*  у тумору, стимулације активације Т и *NK* ћелија и ангиостазе, мењајући баланс про- и анти-ангиогенских хемокина. Ово указује на то да смањење *MDSC* не само да утиче на антиген презентујуће ћелије, *NK* и Т-ћелијске имунске активности, већ стимулацијом ангиостазе доводи до ефикасније контроле раста тумора.

Ретки подаци који сведоче о *MDSC* код болесника са карциномом плућа односе се на вредности ове популације у системској циркулацији. Истраживања карактеристика у микроциркулацији тумора плућа требало би да дају прецизније

податке о улози *MDSC* у микрооколини самог тумора, односно, о њиховом могућем утицају на локални имунски одговор.

У *MDSC* спада мала група мијелоидних прогенитора (*Lin-HLA-DR-CD33+* ћелије), незреле мононуклеарне ћелије морфолошки и фенотипски сличне моноцитима (*CD14+ HLA-DR-lo* ћелије) и незрели полиморфонуклеари морфолошки и фенотипски слични неутрофилима (*CD14+ CD15+* или *CD66b+* ћелије) (28). Карактеристике ових ћелија огледају се у експресији велике количине *NADPH*-оксидазе, што резултира повећаном продукцијом реактивних метаболита кисеоника у форми супероксид анјона, хидроген пероксида и пероксинитрита. Такође се карактеристике ових ћелија уочавају у повећаној експресији гена за аргиназу 1 и азот оксид синтетазу, што доводи до повећане производње аргиназе 1 и азот оксида, затим повећане експресије транскрипционих регулатора *EBPb* и *STAT3*. Поред тога, настају и смањена експресија *IRF8* и повећана продукција *S100A8/9* протеина. Због свега тога у резултату настаје смањена способност диференцијације у зреле мијелоидне ћелије.

Имуносупресивна улога *MDSC* је веома компликована, а главни фактори у овом процесу су експресија аргиназе 1, индуцибилне азот оксид синтетазе, *TGF-b*, *IL-10* и *COX-2*, секвестрација цистеина, смањена експресија *L*-селектина Т ћелија и индукција Т регулаторних ћелија (28). Поремећај посредован *MDSC* у Т ћелијама јесте нисходна регулација *CD247*, који је присутан и у *NK* ћелијама у условима хроничне инфламације и у присуству тумора, јер смањена вредност *CD247* указује на нефункционалност Т ћелијског рецептора (56). *MDSC* посредована деплеција *L*-аргинина активношћу аргиназе-1 и депривација *L*-цистеина путем његове секвестрације су исто тако веома битни. Такође се јавља интерференција са сигнализацијом преко *IL-2* рецептора. *MDSC* ћелије могу угрозити и миграцију



ефекторских *CD8+* Т ћелија на место тумора. Тумор инфилтришуће дендритске ћелије су такође погођене због незрелог фенотипа и толеранције према туморским антигенима. *MDSC* продукују *VEGF* и *IL-10*, доводе до активације *STAT3* у дендритичним ћелијама и супресије имунског одговора. *MDSC* активирају регулаторне Т ћелије. Реактивне кисеоничне врсте и азот-оксид доводе до геномске нестабилности и соматских мутација, а такође долази и до модулације експресије информационе РНК и индукције епигенетских промена. *MDSC* секретују и факторе који индиректно/директно подржавају иницијацију и раст тумора. Тумори у развоју секретују факторе који обезбеђују експресију *MDSC* и њихову супресивну активност. Као што се види из свега наведеног, *MDSC* користе различите механизме имунске супресије. Незреле мононуклеарне ћелије морфолошки и фенотипски сличне моноцитима супримирају и антиген-специфични и неспецифични Т ћелијски одговор преко механизма повезаних са азот-оксидам и цитокинима, док незрели полиморфонуклеари морфолошки и фенотипски слични неутрофилима супримирају само антиген-специфичан начин преко механизма повезаних са производњом кисеоничних слободних радикала. Ове ћелије директно инхибирају Т ћелије нитрирањем Т ћелијског рецептора, чиме се смањује њихов одговор након препознавања комплекса антиген-*MHC*. Нитрирање смањује везивање антигених пептида за *MHC* на туморским ћелијама и блокира се миграција Т ћелија нитрирањем Т ћелијски специфичних хемокина. Високи нивои реактивних врста кисеоника утичу на Т ћелије преко нисходне регулације Т-ћелијског површинског гликопротеина *CD3*  $\zeta$  ланца и смањења секреције цитокина (57).

Улога *MDSC* у регулацији развоја и прогресије тумора је велика (28). Оне штите туморске ћелије од цитотоксичног одговора, доводе до ремоделовања туморског микроокружења преко протеолитичких ензима (нпр. матриксне

металопротеиназе), као и неопходних медијатора неоангиогенезе и туморске инвазије (*VEGF*, *bFGF*, *VEGF* аналога *BV8* и матрикс металопротеиназе 9), и формирају преметастатско окружење стварањем карактеристичних матичних ћелија у туморском ткиву, доводећи до пораста степена метастазирања *in vivo*, као и индукције епително-мезенхималне транзиције (*EMT*). Кад у оваквом окружењу настану типичне *MDSC* као одговор на стимулусе инфламације, оне не поседују имуносупресивну активност, већ доприносе туморогенези регрутовањем проинфламаторних *CD4+* Т ћелија које подстичу пролиферацију епителних ћелија. Управо развој тумора је повезан са експанзијом ћелија које поседују имуносупресивну активност (*MDSC*). Ове ћелије подстичу инвазију туморских ћелија и ангиогенезу, те неутрализују туморско старење. У метастатским туморима *MDSC* поред подстицања инвазије и ангиогенезе, узрокују још и епително мезенхималну транзицију (*EMT*) и диференцијацију остеокласта што доводи до ресорпције костију.

Утицај локализације на функцију *MDSC* је такође показан (28). Инхибиција Т ћелија од стране *MDSC* у периферним лимфоидним органима захтева блиски контакт између ћелија. *MDSC* у тумору имају потентнију супресорску активност. Проценат незрелих мононуклеарних ћелија морфолошки и фенотипски сличних моноцитима је знатно већи у ћелијама добијеним од тумора, док је удео незрелих полиморфонуклеара морфолошки и фенотипски сличних неутрофилима у периферним лимфоидним органима већи од 70% у односу на укупан број свих ћелија у њима.

Ове ћелије се повезују са резистенцијом на антитуморску терапију (28). Показано је да је клинички одговор на бројне хемотерапеутике у негативној корелацији са бројем *MDSC* ћелија.

Биомаркери који би могли да дају податке о имунском систему јесу следећи: *MDSC* нивои у односу на фенотип *CD11b+ CD33+ HLA-DR low/- CD14+* за незреле мононуклеарне ћелије морфолошки и фенотипски сличне моноцитима и *CD11b+ CD33+ HLA-DR low/- CD15+* за незреле полиморфонуклеаре морфолошки и фенотипски сличне неутрофилима (28). Производњу азот-оксида и кисеоничних слободних радикала можемо мерити у својству маркера њихове супресивне функције. Ниво експресије *CD247* у Т ћелијама такође је битно одређивати. Према нивоима ових маркера пацијенти се деле у две групе. Једну групу чине они који имају смањен број *MDSC* и низак ниво азот-оксида и слободних кисеоничних радикала, што је одлика нормалног имунског статуса без присуства хроничне инфламације, те су ови пацијенти добри кандидати за имунолошку терапију. Другој групи припадају они који имају повећан број *MDSC* и висок ниво азот-оксида и слободних кисеоничних радикала, као и смањен *CD247*, па је код њих претретман неопходан да супримира имуносупресију, што је могуће уз помоћ неутрализације хроничне инфламације или директним утицајем на *MDSC*, након чега се примењује антитуморска терапија.

Имуносупресија која настаје услед хроничне инфламације током туморског развоја је озбиљна препрека ефикасној терапији (28). При одабиру адекватне терапије неопходно је узети у обзир не само туморске параметре, врсту тумора и његов стадијум, већ и имунски статус пацијента. На основу биомаркера пацијенти се деле у две групе. Једној групи припадају пацијенти који показују очувану функционалност имунског система и могу се лечити комбинацијом хемиотерапије и имунолошке терапије. У другој групи су оболели који показују карактеристике супримираног имунског одговора и код њих је циљ смањење постојеће инфламације и имуносупресије пре започињања терапије. Сви пацијенти морају бити праћени

током и након терапије како би се пратили туморски и имунски параметри. Ако ове контроле укажу на оштећење имунског одговора, упркос постигнутој регресији болести, ово би могло да сугерише релапс болести. Откривањем све већег броја биомаркера који указују на стање имунског система пацијената може се развити низ сензора који би у комбинацији са генетским и биолошким параметрима тумора могли да допринесу стварању оптималне персонализоване терапије.

### 1.3. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома

У експерименталним студијама, код мишева са тумором, идентификоване су имуносупресивне гранулоцитне и моноцитне *MDSC* (58). Показано је да тумори имају способност да модулирају и мењају диференцијацију мијелоидних ћелија. Један од механизма којим тумор модификује домаћинов антитуморски имунитет јесте нарушавање диференцијације дендритских ћелија уз присуство незрелих мијелоидних ћелија и *CD34+* прогениторских ћелија (59, 60). Акумулација и отпорност дуговечних незрелих гранулоцита *MDSC* са Т-ћелијски супресивном функцијом и оштећеним миграторним особинама у периферној крви пацијената са карциномима показана је у недавној студији (58). Такође је показано да хуманим неутрофилним *MDSC* недостаје експресија важних рецептора хемокина која одговара инфламаторним хемокинима. Последице ово би могло драматично да наруши њихову способност да мигрирају у малигном ткиву. Уместо тога *MDSC* ћелије би остале у периферној крви, највероватније у продуженом временском периоду у поређењу са конвенционалним полиморфонуклеарима, услед њихове смањене способности апоптозе. Насупрот мишевима, Т-ћелијски-супресивна способност хуманих *MDSC* не може да се тестира *in vivo*. Иако су *MDSC* код мишева

са тумором релативно добро дефинисане (61, 62), ћелијска активност и функција хуманих *MDSC* је слабо дефинисана. Често коришћена комбинација маркера за хумане *MDSC* укључује *CD33+/CD11b+/HLA-DR-* и *CD14+/HLA-DR<sup>low</sup>* да би се дефинисали моноцитни *MDSC* који обично не показују *CD14* (63,64,65,66). У другим студијама је коришћен *CD66b+/CD15+/CD11b+/CD14-* за идентификацију гранулоцитних *MDSC* (67).

Прогресија тумора се често повезује са хроничном инфламацијом у микроокружењу тумора, посредованом бројним цитокинима, хемокинима и факторима раста које производе карциномске ћелије и ћелије строме (68). Сви ови посредници подстичу развој тумора и имуносупресију аутокриним и/или паракриним путевима. Међу строма ћелијама које се инфилтрирају у туморе, *MDSC* представљају једне од најважнијих посредника у имуносупресији. Ове ћелије не само да могу да спрече анти-туморски имунитет, већ директно стимулишу туморогенезу као и раст тумора и његово ширење. Стога је разумевање механизма стварања, миграције до места тумора и активација *MDSC* неопходна за разумевање постојећих и развој нових стратегија имунске терапије тумора.

*MDSC* су незреле мијелоидне ћелије које не успеју да се диференцирају у гранулоците, макрофаге и дендритске ћелије у хроничним инфламаторним условима и које показују имуносупресивне функције вишеструким механизмима (69). Ове ћелије су веома хетерогене и стога су њихове фенотипске карактеристике веома различите. Код хуманих *MDSC*, исти подсетови могу да се разликују као *Lin-HLA-DR-CD33+* или *CD11b+CD14-CD15+* за гранулоцитне и *CD14+HLA-DR<sup>neg/lo</sup>* или *CD11b+CD14+HLA-DR<sup>neg/lo</sup>* за моноцитне *MDSC*. *MDSC* настају из претходника хематопоезе костне сржи због мењања мијелопоезе од стране хроничних инфламаторних медијатора (70, 71, 72) и показују значајне имуносупресивне и

туморогене активности (70, 66). Ове ћелије, *MDSC*, стварају ангиогене факторе - промоторе неоангиогенезе (73), као и факторе раста, матрикс металопротеиназе и цитокине који стимулишу раст тумора и усмеравају имунске одговоре према Th2 типу и регулаторним Т ћелијама; депривирају аргинин и цистеин који су потребни за функционисање Т ћелија и производе азот оксид (*NO*) и реактивне кисеоник врсте (*ROS*) који изазивају нитрацију Т ћелијског рецептора или апоптозу Т ћелија; експримирају мембрански-везан *TGF-β1* који доводи до анергије имунских ефекторних ћелија; одговорне су за нисходну регулацију експресије *TCR* ζ-ланца тако онемогућавајући Т ћелије да преносе активационе сигнале. Узевши све наведено у обзир, *MDSC* се могу сматрати кључним факторима у тумор-посредованој имуносупресији (68).

До сада је показана снажна веза између тумор-посредованог хроничног запаљења и системске експанзије и активације *MDSC* (70). Неутрализација хроничних инфламаторних услова довела је до наглог опадања броја имуносупресивних функција тумор-инфилтрирајућих *MDSC* (74, 75). Насупрот томе, ескалација хроничног запаљења изазваног циклофосфамидом проузроковала је додатну експанзију, активацију и акумулацију *MDSC* у лезијама тумора. Познато је да је процес стварања, миграције и активације *MDSC* под контролом различитих посредника хроничног запаљења као што су фактори раста (*GM-CSF*, *G-CSF*, *M-CSF*, *VEGF*, *TGF-β*), цитокини (*IL-1β*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-13*, *TNF-α*, и *IFN-γ*), хемокини (*CCL2*, *CCL4*, *CCL5*, *CXCL1*, *CXCL8* и *CXCL12*), циклооксигеназа-2 и простагландин *E2* (69, 76, 77). Ефекат свих ових фактора је комбинаторан и зависан од дозе. Они модулирају мијелоидне ћелије у туморској микросредини и пошто се достављају до удаљених хематопоетичких органа уз помоћ туморских егзозома, могу да промене мијелопоезу и окрену нормалну диференцијацију мијелоидних ћелија у

корист *MDSC* (69, 76, 77, 78). До сада је пронађено да су *VEGF* и *TGF- $\beta$*  такође укључени у регулацију хематопоезе (79, 80). Оба фактора се производе у великим количинама од стране многих тумора и имају снажан утицај на стварање и ширење *MDSC*.

Такође је показано да *MDSC* подржавају неоангиогенезу, раст тумора и метастазирање (70, 81, 82). За ове ћелије се зна да производе *VEGF*, основни фибробластни фактор раста (*bFGF*), хипоксијом-изазван фактор 1 (*HIF-1*), трансформишући фактор раста  $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) и матрикс металопротеиназа 9 (*MMP9*), који промовишу неоангиогенезу и стварају преметастатску средину (82, 83). Такође је пронађено да *SI00A8/A9* инфламаторни протеини, произведени од стране *MDSC*, не само да привлаче *MDSC* на место тумора и повећавају њихову имуносупресивну активност, већ и да помажу активацију *MAPK* и *NF- $\kappa$ B* сигнализирајући стазе у туморским ћелијама и стимулишући тиме раст тумора и метастазирање (83, 84). Уз то, *MDSC* су способне да снажно утичу на прогресију тумора успостављајући анти-туморске имунске одговоре различитим механизмима (85, 86, 87). Стога неутрализација *MDSC*-изазване супресије представља важну стратегију за развој ефикаснијих туморских имунских терапија.

Уопштено посматрајући, *MDSC* користе одређен број механизма да сузбију и ослабе функцију Т ћелија. То укључује висок ниво активности аргиназе, као и *NO* и производњу *ROS* (61, 88, 89). Ови главни механизми се повезују са различитим подтипovima *MDSC*: *ROS* са гранулоцитним-*MDSC*, док аргиназе и *NO* са моноцитним-*MDSC* (91, 90). Недавно је указано на неколико других супресивних механизма: секрецију *TGF  $\beta$*  (92, 93), индукцију регулаторних Т ћелија (94, 95), смањење цистеина (96), узлазну регулацију циклооксигеназе 2 и простагландина *E2* (97). Простагландини, нарочито *E2*, широко су укључени у *MDSC*-посредовану Т-

ћелијску инхибицију. У ранијој студији је пронађено да сигнали путем *E2* рецептора Е-простаноида (EP) 4 у *MDSC* изазивају аргиназа 1 експресију и активност (97).

Кључно питање је како се регулише акумулација *MDSC* током експанзије тумора. То се објашњава преко неколико сигналних путева. Сигнални трансдуктор и активатор транскрипције 3 (*STAT 3*) има централну улогу у многим молекуларним догађајима који управљају пролиферацијом тумора, преживљавањем и инвазијом. У исто време *STAT 3* је укључен у инхибицију антитуморских имунских одговора (98). У мијелоидним ћелијама, *STAT 3* сигнали изазивају експресију *Bcl-xL*, *c-myc*, *ciklin D1*, или *survivin*, који спречава ћелијску апоптозу, подстиче ћелијску пролиферацију и спречава диференцијацију у зреле ћелијске типове (61). Претходне студије су одредиле важну улогу за *STAT 3* приликом експанзије *MDSC* код мишева (99, 100) и за допринос *MDSC* ангиогенези (101). Показана је и повезаност између горње регулисане активације *STAT 3* и акумулације *MDSC* код пацијената са меланомом (102). *STAT 3* је такође од кључне важности за супресивну активност *MDSC*. Инхибиција *STAT 3 in vitro* довела је до укидања супресивне активности *MDSC*. Важна улога *STAT 3* у експанзији *MDSC* је даље подржана другом студијом која је користила мултитаргетни тирозин киназни инхибитор сунитиниб (103). Сунитиниб је блокирао експанзију *MDSC* код мишева са тумором инхибицијом *STAT 3* сигнала у мијелоидним ћелијама. Мијелоидна ћелијски-специфична превелика експресија инхибитора апоптозе 6 (*API6*) изазвала је активацију *STAT 3* у мијелоидним ћелијама и системску експанзију *MDSC*.

Значајни путеви регулације преко *STAT 3* пута укључују проинфламаторне протеине *S100A9* и *S100A8* (104). Активација *STAT 3* прогениторних ћелија хематопоезе повећава *S100A8* и *S100A9*, а ово потом спречава диференцијацију дендритских ћелија и потпомаже акумулацију *MDSC* (104). У одсуству *S100A9*,



акумулација *MDSC* је била спречена код мишева са тумором. Истовремено, превелика експресија *S100A9* резултира акумулацијом *MDSC* код мишева који немају тумор (104). *S100A9* такође игра важну улогу у миграцији *MDSC* на место тумора.

Други значајан сигнални пут је *STAT 1*, који представља главни фактор транскрипције кога активира *IFN $\gamma$*  или *IL-1 $\beta$*  сигнал и садржан је у регулацији *iNOS* и активности аргиназе. *MDSC* којима мањка *STAT 1* не могу да спрече активности Т ћелија због немогућности да повећају *iNOS* и активност аргиназе. Блокирањем *IFN $\gamma$*  секреције од стране Т ћелија такође се поништава *MDSC*-посредована супресија углавном путем блокирања *iNOS* узлазне регулације (105, 106). *STAT 5* има пак важну улогу у преживљавању *MDSC* (107). Активација *STAT 6* у *MDSC* се јавља као одговор на везивање *IL-4* или *IL-13* на њихов рецептор *CD124*. Овај рецептор је такође описан као један од *MDSC* маркера и одговоран је за повећање активности аргиназе (108, 109) и повећање *TGF $\beta$*  синтезе у *MDSC* (110). Недавно је показана критична улога *STAT 6* у експанзији *MDSC* после трауматског стреса (111). Тако, *STAT 2*, *5*, и *6* играју важну улогу у *MDSC* активацији и ови *STAT* путеви посредују имуносупресивну функцију *MDSC*.

Упркос напретку који је учињен у претходним годинама у разумевању молекуларних механизма који управљају *MDSC* акумулацијом, многи специфични детаљи остају нејасни (112). Једно од питања је да ли акумулација *MDSC* захтева један или два сигнала. „Једносигнални модел“ значи да један фактор може да започне диференцијацију *MDSC* и њихову активацију у имуно супресивне ћелије. Међутим, вероватнији, „двосигнални модел“ указује на то да експанзија *MDSC* може да се подели у два процеса којима управљају различите сигналне путање. Једна путања је углавном одговорна за експанзију *MDSC*, а друга за управљање

активацијом *MDSC*. Први процес је изазван различитим цитокинима и факторима раста које производе тумори или строма костне сржи као одговор на хроничну стимулацију. То укључује факторе као што су *GM-CSF*, *M-CSF*, *G-CSF*, *IL-6*, *VEGF* и даје сигнализацију путем *STAT 3* и *STAT 5*. Сигнал спречава диференцијацију *MDSC* и помаже пролиферацију незрелих мијелоидних ћелија. Међутим, овај сигнал сам по себи није довољан да се активира акумулација *MDSC*, јер оне захтевају други сигнал активације који се манифестује повећањем аргиназе, *NO*, производње имуно супресивних цитокина, итд. Овај тип сигнала је обезбеђен про-инфламаторним молекулама као што су *IFN $\gamma$* , *IL-1  $\beta$* , *IL-13*, *TLR* лигандима и другим. Он користи *STAT 1* и *NF- $\kappa$ B* факторе транскрипције и узлазну регулацију *Cox2*. Овај модел би могао да објасни зашто активација *STAT 3* и *STAT 5* у одговору на различите факторе раста који су потребни за нормалну хематопоезу не резултира акумулацијом *MDSC* у одсуству јаких сигнала про-инфламаторних фактора. Такође би могао да објасни зашто акутна инфламација, повезана са отпуштањем про-инфламаторних фактора у одсуству непрекидног повећавања фактора раста, не резултира акумулацијом *MDSC*. Као што је увек случај код биолошких система, претпоставља се да и овде постоји преклапање наведених сигналних путања. У равнотежном, стабилном стању хематопоезе различити фактори могу да допринесу покретању диференцијације према једном или другом подсету *MDSC*. Такође, фактори транскрипције могу да модулирају активност један другом, као што је показано, на пример *STAT 3* и *NF- $\kappa$ B*. Међутим, овај модел указује да је акумулација *MDSC* могућа само ако су обезбеђена два сигнала.

#### 1.4. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома плућа

Велики број актуелних студија је фокусиран на фенотипској карактеризацији субпопулација *MDSC* и њиховом клиничком значају за пацијенте са карциномом плућа типа *NSCLC*. Хуанг (А. Huang) и сарадници су идентификовали део *MDSC* које производе слободне кисеоничне радикале (*CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup>/low*) и које су повезане са присуством удаљених метастаза и лошим одговором на хемиотерапију (113). Слично је показала и студија Фенга (Р. Feng) и сарадника да моноцитна *MDSC* субпопулација (*CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> S100A9<sup>+</sup>*) има негативан утицај на преживљавање и терапијски одговор пацијената са узнатредовалим *NSCLC* на терапију платином (114). Такође је идентификована једна гранулоцитна (*CD14<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>*) и две фенотипски различите моноцитне (*CD14<sup>+</sup> CD15<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>* и *CD14<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>*) *MDSC* субпопулације које су значајно порасле у периферној крви код хемиотерапијски наивних пацијената са *NSCLC* и биле су у корелацији са клиничким исходом пацијената (115).

Студија која је обухватила 185 пацијената са *NSCLC* показала је да је учесталост *CD16low CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> HLADR<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>* у полиморфонуклеарној субпопулацији *MDSC* значајно повећана у поређењу са здравом контролном групом (116). Лиу (С. Liu) и сарадници су идентификовали *MDSC* са *CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>* фенотипом код пацијената са узнатредовалим *NSCLC* који још нису били лечени хемиотерапијом (117). Ове ћелије су експримирале *IL-4R*, *IFN-γR*, *Arg-1* и *iNOS* и инхибирале *CD3ζ* експресију у *CD8<sup>+</sup>* Т лимфоцитима. Поред тога, *CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> MDSC* број је био смањен код пацијената који су адекватно одговорили на терапију. Такође је показано да су високи нивои *CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>S100A9<sup>+</sup>*

моноцитних *MDSC* били повезани са лошим одговором на хемиотерапију засновану на цисплатини, што је било у корелацији са скраћеним преживљавањем без прогресије болести (114).

Хуанг и сарадници су приметили да су и апсолутни број и процентуални удео *CD14+HLA-DR-/low* ћелија повећани код пацијената са метастаским обликом *NSCLC* (118). И проценат и апсолутни број *CD14+HLA-DR-/low* ћелија пре терапије негативно су корелирали са клиничким одговором и временом до прогресије болести након хемиотерапије засноване на цисплатини код пацијената са узнапредовалим *NSCLC*, што сугерише на то да повећани нивои имуносупресивних *CD14+ HLA-DR-/low* ћелија могу бити повезани са лошом прогнозом код пацијената са *NSCLC*.

Код пацијената са ситноћелијским карциномом плућа слично је показано да је учесталост *CD14+HLA-DR-/low MDSC* негативно корелирала са клиничким исходима (119). Такође је идентификована нова субпопулација *MDSC* у микроокружењу тумора пацијената са *NSCLC*, *B7-H3 CD14 HLA-DR-/low (B7-H3 MDSC)* (120). Повишена учесталост ове нове субпопулације корелира са лошијим *TNM* стадијумом и метастазама тумора и може бити предиктор лошијег преживљавања, краћег времена до прогресије болести и релапса болести код пацијената са *NSCLC*. Истраживања су показала да *B7-H3 MDSC* подстичу прогресију тумора производећи *IL-10* који индукује Т регулаторне ћелије у микроокружењу тумора.

Новије студије указују на значај и утицај *MDSC* на терапију код пацијената са карциномима плућа (121), у смислу најбољег одабира хемиотерапије за ове пацијенте и раном предвиђању могућег лошег одговора на одређену врсту терапијске линије. Међутим, потребна су даља истраживања у овом правцу и, будући

да су многе информације добијене у експерименталним моделима, потребне су шире клиничке студије.

*B7H4* припада *B7* суперфамилији чланова костимулаторних молекула који имају улогу модулятора инхибиторних одговора Т ћелија. На тај начин ови молекули учествују у имунској толеранцији туморских ћелија, пошто равнотежа између костимулишућих и коинхибиторских сигнала утиче на ниво активирања антитуморског одговора (122). *B7H4* дели око 25% хомологије аминокиселина са осталим члановима породице *B7* (123,124). *B7H4* може деловати као коинхибитор одговора Т ћелија и урођеног имунитета (125, 126). Пошто је *B7H4* изразито експримиран у свим ћелијским линијама карцинома дебелог црева, простате, плућа, желуца, фибросаркома и меланома (127, 128, 129, 130, 131), може се претпоставити да је експресија *B7H4* механизам смањене регулације антитуморског имунитета, нарочито Т ћелијског одговора на нивоу ћелије ефектора (128). Такође, солубилни *B7H4* идентификован је у узорцима крви пацијената са карциномом јајника, дебелог црева, бубрега, дојке, плућа, карцинома простате (131, 132, 133, 134, 135, 136, 137). Ова испитивања показују да серумски *B7H4* може бити користан дијагностички и прогностички маркер.

Сложеност сигнализације посредоване *toll-like* рецептором додатно се повећава преко његових корецептора (нпр. *CD14*, *CD36*) (138). *CD14* је мембрански гликопротеин потребан за *toll-like* рецептор 4 сигнализацију у одговору на липополисахарид (*LPS*) и грам-негативне бактеријске делове ћелијског зида (139). Супротно томе, *toll-like* рецептор 2 заслужан је за одговоре на грам-позитивне бактерије и захтева *CD14* само за одабране лиганде (140). *CD14* је веома важан у процесу инвазије микрооколине карцинома и проинфламаторној реакцији (140). Пошто је инфламација зависна од присуства *CD14* у макрофагима (141), *CD14* би

могао да игра кључну улогу у покретању хроничне инфламаторне реакције и значајно да допринесе прогресији тумора. Производња *Biglycan/CD14* од стране хемокина *CCL2* и *CCL5* може бити разлог за инфилтрацију макрофага и Т ћелија на место тумора (141). Хемокини *CCL2* и *CCL5* су изгледа критични регулатори инфилтрације тумор повезаних макрофага (енг. *tumor associated macrophages- TAM*) и промовишу екстравазацију и метастазирање карцинома (142, 143).

*CD23* антиген је такође мембрански протеин који има значаја у канцерогенези и инфламацији повезаној са туморима (144). Штавише, давно је уочено да ниво позитивности на *CD23* има прогностичку вредност код одређених врста малигнитета (145). У неким извештајима ниво експресије *CD23* је био повезан са добром прогнозом (145), док су други истраживачи *CD23* експресију повезивали са агресивнијим током (146). Пошто је *CD23* активациони маркер, многи цитокини могу модулирати његову експресију на ћелијској мембрани (144). *CD23* је рецептор ниског афинитета за имуноглобулин Е (*IgE*) и учествује у регулаторним процесима као мембрански везани гликопротеин, или као слободно растворљиви протеин (147). Молекуларна испитивања и испитивања мутагенезе дефинисала су улогу овог молекула у обављању многих биолошких функција. Повишен *CD23*, било на површинама неопластичних ћелија или као растворљив облик, представља користан показатељ у дијагнози и у прогнози болести. Тако су ћелије добијене од различитих врста хематолошких тумора имале повишен ниво *CD23* (147). У једној од студија, након анализе експресије, показана су три различита маркера *ADAM8* (енг. *disintegrin and metalloproteinase domain-8*), *CD23* и *CHL1* (енг. *neural-cell adhesion molecule-homologue of L1*). У ћелијским линијама рака плућа и ткивима карцинома плућа у већини ћелијских линија карцинома плућа експресија *CD23* није била откривена

(148). Стога, информације о улози овог молекула код карцинома плућа и даље су недовољне.

Карцином плућа индукује локалну и системску имуносупресију. Један од механизма имуносупресије је и повећана експресија лиганда програмиране смрти 1 (*PD-L1*) код мијелоидних ћелија, тумором индукована. Показало се да је учесталост *PD-L1*<sup>+</sup> мијелоидних ћелија у корелацији са присуством можданих метастаза. *IL-6* добијен из тумора у стању је да индукује *PD-L1*<sup>+</sup> мијелоидне ћелије *in vitro*, сугеришући тиме да праћење нивоа имуносупресивних фактора у периферној крви може да идентификује нове мете за терапијску интервенцију код одабраних пацијената.

Метаанализа студија различитих пацијената са солидним туморима показала је да су *MDSC* значајно повезане са укупним преживљавањем и временом без прогресије болести (енг. *progression-free survival PFS*) (149). *MDSC* су повезане са антитуморским лековима (114, 150, 151, 152). У регулацију *MDSC* укључени су различити сигнални путеви и цитокини (121). Интеракција ових различитих фактора представља веома сложен систем контроле мреже која регулише стварање и функцију *MDSC*. Да би се успешно применио третман против карцинома плућа, морају се блокирати *MDSC*, као главна имуносупресивна популација ћелија у туморима.

*MDSC* су важни регулатори имунског одговора (153). Ове ћелије сузбијају цитотоксичне активности ћелија природних убица (*NK natural killer*) и Т ћелијских ефектора и тако помажу раст тумора. Показано је да смањивање *MDSC* побољшава терапијске одговоре на вакцину на мишијим моделима плућног карцинома. Овај приступ се може показати корисним код тумора код којих *MDSC* испољавају важне имуносупресивне ефекте. Смањење *MDSC* репрограмира туморску нишу мењајући

инфламацијске одговоре, па се тиме омогућава антитуморски имунски одговор, као и стварање имунске меморије. Деловањем одговарајућим агенсима на мењање функције *MDSC* би омогућило контролу раста тумора. Такође је неопходно испитати ефикасност у комбинацији са другим имуномодулаторним стратегијама. Комбиновани приступи који смањују сигналне путеве регулисане *MDSC*, обнављају активност антиген презентујућих ћелија и доводе до експанзије тумор-реактивних Т ћелија, могу бити од користи у побољшању ефикасности имуномодулаторне терапије плућног карцинома.

Евалуацијом генетских секвенци тумора који одржавају раст тумора путем модулације имунске активности, показано је да конститутивна прекомерна експресија туморске циклооксигеназе 2 доводи до имуносупресије карцинома плућа (25). Прекомерна експресија циклооксигеназе 2 је повезивана са смањеним имунитетом домаћина и метастазирањем. Показано је да циклооксигеназа 2 модулира активност *MDSC* код карцинома плућа повећаном синтезом *ARG1*, који блокира функцију Т ћелија преко простагландин-изазване имунске дисфункције, чиме је објашњен антитуморски бенефит циклооксигеназа 2 инхибитора. Поред тога, сложене интеракције између *MDSC* и *Treg* ћелија тек треба да буду дефинисане. Међутим, евидентно је да *MDSC* помажу развој *Treg* ћелија *in vivo*. Тумор-реактивне Т ћелије су пронађене у ткиву плућног карцинома, али не одговарају на тумор због *CD4+CD25+ Treg* ћелија. *CD4+CD25+ Treg* ћелије имају важну улогу у одржавању имунске само-толеранције и сузбијању антитуморских имунских одговора посредованих путем само-реактивних лимфоцита. Смањивање броја *Treg* ћелија, или укидање њихове активности у оквиру туморске микрооколине, могло би да побољша ефективни антитуморски одговор код оних домаћина који иначе не одговарају активирањем тумор-специфичних и неспецифичних ефекторских ћелија.



Иако имунолошка терапија за карцином плућа има потенцијал, нема доказа који указују на документоване бенефите када је у питању преживљавање (25). Тумором изазвана имуносупресија путем *MDSC* би могла бити доприносила фактор ограниченој ефикасности ових приступа. У једној недавној студији, аутори су тестирали хипотезу да активирање имунских ћелија путем терапијске вакцине и прекида *MDSC*-посредоване имуносупресије побољшава антитуморску активност код мишијих модела плућног карцинома. За покретање антиген-специфичних одговора коришћена је ћелијска вакцина, која се састоји од адхерентних ћелија костне сржи повезаних са антигеном овалбумина (*OVA*) продукованог од стране генетски модификованих 3LL ћелија. Адхерентне ћелије костне сржи повезане су са *OVA* антигеном како би се омогућила њихова антигенска презентација. Потом су оне убризгане субкутано у мишеве на контралатералној страни насталог тумора, како би се покренули антиген-специфични антитуморски имунски одговори. Да би се осујетила *MDSC*-посредована имуносупресија, популација *MDSC* је смањена моноклонским антителима (*anti Gr1* или *anti-Ly6G*).

Велико смањење *MDSC* популације антителима на *Gr1* или *Ly6G* довело је до смањења *MDSC* у тумору и системски у крви, слезини и коштаном сржи (25). Активност антиген презентујућих ћелија (*APC*) у тумору је смањена са прогресијом тумора. Међутим, смањење *MDSC* доводи до повећане учесталости и активности *APC*, *NK* ћелија и Т ћелијских ефектора. Заједно са повећаним *NK* и Т ћелијским активностима, било је повећања учесталости апоптозе туморских ћелија и истовременог смањења туморског терета. Редукција раста тумора и смањење миграције туморских ћелија може бити објашњено повећањем учесталости активираних Т и/или *NK* ефектор-посредоване тумор апоптозе и/или *NK IFN-γ*-посредоване ангиогенезе. Пратећи смањење *MDSC*, антиангиогенски хемокини

*CXCL9* и *CXCL10* повећани су и про-ангиогенски цитокини *VEGF-A*, ангиопоетин 1, ангиопоетин 2, *CXCL2* и *CXCL5* значајно су смањени. Пратећи овај профил, ендотелни маркери у тумору МЕСА-32 су смањени, али је било повећања *CXCR3* експресије. Смањење *MDSC* је водило до прилива *IFN-γ* активираних Т и *NK* ћелија које су помогле ангиостазу у тумору мењајући равнотежу про- и антиангиогенских хемокина. Ово указује на то да смањење *MDSC* не само да побољшава *APC*, *NK* ћелије и Т ћелијске имуно активности, већ помаже блокаду ангиогенезе што доводи до ефикасније контроле тумора. Смањење *MDSC* репрограмира туморску нишу мењајући инфламаторне одговоре, дозвољавајући имунску деструкцију тумора и стварање имунолошке меморије. Регулација *MDSC* регрутовања, диференцијације и експанзије, и инхибиција *MDSC* супресивне функције је занимљив терапијски модел у контроли раста и прогресије тумора. Фармаколошки агенси који регулишу *MDSC* могу бити ефикаснији у комбинацији са имунотерапијом. Оптимизација комбинованих приступа, који симултано блокирају *MDSC* супресорске путање, обнављају *APC* имуно-стимулативну активност и повећавају тумор-реактивне Т ћелије, била би корисна за унапређење терапије.

Неколико терапија овог типа су тренутно у фази испитивања и оне могу бити подељене на основу њихове способности да контролишу следеће (154):

- диференцијацију *MDSC* у зреле *DC* и макрофаге способне за активност *APC* (све-транс ретиноичне киселине (*ATRA*) и витамин *D3*);
- сазревање *MDSC* из прекурсора (*STAT 3* инхибитори, бевацизумаб, анти-*BV8* моноклонска антитела, аминок-бифосфонати и *MMP9* инхибитори);
- пролиферацију *MDSC* (инхибитори тирозин киназе (*TKI*), сунитиниб и сорефниб);

- акумулацију *MDSC* (*CXCR2* и *CXCR4* антагонисти);
- цитотоксичност *MDSC* (гемцитабин, 5-флуоро-урацил);
- функцију/активацију *MDSC* (*ROS* чистачи, *ARG* и *NOX* инхибитори, нпр. нитро-аспирин, *PDE-5*, *COX-2* инхибитори и цитокини).

Један приступ терапијског циљања *MDSC* је и коришћење агенаса да се помогне диференцијација мијелоидних ћелија. Габрилович (D. Gabrilovich) и сарадници су показали да диференцијацијом *MDSC* у *DC* и макрофаге коришћењем *ATRA* (*all-trans retinoic acid*) смањује број *MDSC* и повећава одговоре на вакцине против карцинома (155). *ATRA* изазива диференцијацију *MDSC* пре свега путем неутрализације високе продукције *ROS* у овим ћелијама. Механизам укључује усходну регулацију глутатион синтазе и акумулацију глутатиона у *MDSC* и могао би да се користи у развоју и праћењу терапијске апликације *ATRA*. Због тога модулација развоја *MDSC* може бити есенцијална за унапређење имунске терапије против узнатредовалих тумора (156).

*N-acetyl cistein* (*NAC*) је предложен као антитуморски агенс због своје способности да смањи оксидативни стрес који помаже генетску нестабилност. *NAC* третман мишева са прогресивно растућим туморима показао је терапијску ефикасност (157). *NAC* може да има додатни бенефит у омогућавању активације Т ћелија повећавањем екстрацелуларних базена цистеина у присуству високог нивоа *MDSC* код пацијената са карциномом. Иако *NAC* циља цистеинску путању *MDSC*-посредоване супресије Т ћелија, *MDSC* производња аргиназе и *NO* и даље може да задржи супресивне ефекте *MDSC*. Међутим, примена *NAC* у комбинацији са другим агенсима који блокирају додатне *MDSC* супресивне путање (*ARG1* и *NO*), може бити ефикаснија у блокирању *MDSC*.

На основу свега наведеног може се закључити да је значај *MDSC* евидентан, али да је супресија имунског одговора домаћина на туморско ткиво посредством ових ћелија још увек недовољно истражена, па су у овој докторској дисертацији постављене хипотезе и циљеви истраживања, који ће бити изнети у наставку.

## **2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ**

### **А. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ**

1. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима системске циркулације пацијената са тумором плућа је већа у односу на процентуалну заступљеност *MDSC* у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.
2. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора је већа у односу на процентуалну заступљеност *MDSC* у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.
3. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора плућа значајно се разликује од процентуалне заступљености *MDSC* у системској циркулацији болесника са карциномом плућа.
4. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима системске циркулације и у узорцима микроциркулације тумора плућа корелира са патохистолошким карактеристикама и клиничким стадијумом карцинома плућа.

### **Б. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ**

1. Испитати процентуалну заступљеност *MDSC* у периферној крви пацијената оболелих од карцинома плућа.
2. Испитати процентуалну заступљеност *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора.
3. Испитати процентуалну заступљеност *MDSC* у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.

4. Утврдити корелацију процентуалне заступљености *MDSC* у периферној крви пацијената оболелих од карцинома плућа са патохистолошким типом тумора, величином тумора, нодалним статусом, присуством метастаза и клиничким стадијумом.
5. Утврдити корелацију процентуалне заступљености *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора са патохистолошким типом тумора, величином тумора, нодалним статусом, присуством метастаза и клиничким стадијумом.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Истраживање је урађено након добијања сагласности Етичког одбора Војномедицинске академије у Београду. Учествовање у студији је подразумевало потписан Образац информисаног пристанка пацијента, односно његовог овлашћеног лица.

#### **A. ВРСТА СТУДИЈЕ**

Студија је урађена као клиничка опсервациона студија пресека.

#### **Б. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ**

Истраживање је спроведено у Клиници за пулмологију, Институту за патологију и судску медицину и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

У студију је укључено 54 пацијената у старосној доби од 18 до 75 година, код којих је због утврђеног постојања инфилтративне промене у плућима (радиографским методама) урађена дијагностичка бронхоскопија и код којих је патохистолошким прегледом утврђено постојање карцинома плућа.

Контролну групу чинило је 10 здравих особа које обављају редован систематски преглед у Војномедицинској академији и које претходно нису боловале од малигних болести.

Узорци крви и узорци микроциркулације тумора плућа за одређивање броја и карактеристика *MDSC* узимани су током извођења дијагностичке бронхоскопије.

## В. УЗОРКОВАЊЕ

Критеријуми регрутовања болесника у групу испитаника

Критеријум за укључивање у студију био је патохистолошки дијагностикован карцином плућа код пацијената, а пре започињања онколошког лечења.

Критеријуми за искључивање из студије били су: присуство других малигних обољења, присуство аутоимунских обољења, трудноћа и употреба лекова који утичу на хематопоезу (*GM-CSF*) или саме *MDSC* (паклитаксел, синденафил).

Сви испитаници укључени у студију потписали су Образац информисаног пристанка пацијента, одобреног од стране Етичког одбора Војномедицинске академије у коме је детаљно објашњена врста процедуре.

Узимање узорака периферне крви

Од свих испитаника (оболелих и здравих контролних пацијената) узимано је 3 милилитра венске крви. Узорци периферне крви су узети у вакумске епрувете запремине 3 милилитра са *Na-EDTA* као антикоагулантним средством.

Узимање узорака микроциркулације тумора

Узорци микроциркулације крви тумора плућа добијени су приликом дијагностичке бронхоскопије код оних тумора којима је могло да се приступи бронхоскопом и који су на својој површини имали јасно испољене патолошке крвне судове. Аспирација узорка вршена је иглом за аспирацију кроз систем бронхоскопа у



епрувету за крвну слику (са фабрички додатим антикоагулансом - натријум цитратом). Након аспирације око 3 милилитра узорка, одређивања броја вијабилних ћелија у коморици (искључивањем броја мртвих ћелија бојењем трипан плавим) и потврдног бојења на аутоматском крвном бројачу (*ACT diff Beckman Coulter, USA*), ћелије су биле даље обрађиване поступцима хипотоног лизирања и неопходних испирања фосфатним пуфером са натријум хлоридом (*PBS*). По завршетку процедура ћелије су опет избројане на наведени начин, одређен је број вијабилних ћелија и на основу тог броја био је подешен број на  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Таква ћелијска популација је обележавана моноклонским антителима како је наведено у поступку одређивања фенотипске карактеризације ћелијске популације. У узорцима микроциркулације тумора није било проверавано присуство контаминирајућих ћелија. Такође, анализа и/или уклањање апоптотских ћелија није било предвиђено у обради наведених узорака.

#### Постављање патохистолошке дијагнозе карцинома плућа

Узорци тумора добијени у току дијагностичке бронхоскопије су били фиксирани у 5% пуферисаном неутралном формалину, дехидрисани серијом етанола растуће концентрације (75% до апсолутног), просветљени ксилолом и прожети парафином у V.I.P. Сакура апарату за аутоматску фиксацију, дехидратацију и прожимање ткива, па затим укалупљени у парафинске блокове. Парафински блокови су били исечени на микротому на резове дебљине 3-5 $\mu\text{m}$ , затим обојени стандардним хематоксилин-еозин бојењем (*Hematoxylin & Eosin*) и анализирани светлосним микроскопом према *TNM* критеријумима. Имунохистохемијским и хистохемијским методама је био одређен тип тумора.

## Одређивање клиничког стадијума болести

Локализација, величина и распрострањеност тумора утврђена је радиолошким методама (стандардна постериорно-антериорна радиографија плућа и срца, компјутеризована томографија грудног коша, трбуха и главе).

Клинички стадијум болести одређен је према 8. едицији *TNM* класификације карцинома плућа.

## Фенотипска карактеризација *MDSC* из периферне крви

Фенотипска карактеризација жељене ћелијске популације је била одређивана коришћењем различитих комбинација моноклонских антитела специфичних за антигене на хуманим ћелијама. Ћелије су биле истовремено обележаване са пет различитих антитела. Коришћена су следећа моноклонска антитела (анти): *CD15-FITC* и *CD15-PECy7*, *CD33-PE* *CD33-PECy7*, *CD45-ECD* и *CD45-PECy7*, *HLA-DR PE/Cy5*, *CD14-FITC*, *CD16-PE*, *CD11b-PE*, *CD10-PECy7*, *CD3-FITC*, *CD19-FITC* и *CD56-FITC* (*Biolegend, USA*).

*MDSC* су идентификоване имунофенотипски. Укупна *MDSC* популација је била иницијално идентификована на основу испољавања *CD11b* и *HLA-DR* антигена на двоструком тзв. „*dot blot*“ хистограму (хистограму начињеном на основу тачкастог приказа догађаја анализираних протоком кроз проточну комору цитометра у дефинисаним регионима). Укупна *MDSC* популација је анализирана према испољавању тзв. линијских маркера (*CD3*, *CD19* и *CD56*), као и испољавању *CD10*, *CD14*, *CD15*, *CD16* и *CD45* антигена. Даља подела *MDSC* популације на *MDSC* налик

гранулоцитима (*GrMDSC*) и налик моноцитима (*MoMDSC*) је учињена на основу *CD15* и *CD14* антигена. Популација *GrMDSC* у односу на популацију зрелих гранулоцита је даље анализирана на основу испољавања *CD10* антигена као и на основу анализе маркера *CD11b*, *CD15*, *CD16*, *CD33* и *CD45*. Популација *MoMDSC* у односу на популацију зрелих моноцита је даље анализирана на основу испољавања *CD14* и *HLA-DR*, као и на основу анализе маркера *CD11b*, *CD16* и *CD45*. Проценат, релативни број *MDSC*, изражаван је као проценат свих нуклеисаних ћелија. Обележавање, као и анализа, *MDSC* популације истоветна је приступу који је наведен у ранијој референци из исте лабораторије у којој је рађена и садашња дијагностика (158).

Фенотипска карактеризација *MDSC* из микроциркулације тумора

Фенотипска анализа популација ћелија из узорка микроциркулације тумора је била учињена на потпуно исти начин као и из узорка периферне крви.

## Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ

Независне варијабле:

Свим пацијентима на почетку испитивања је урађена стандардна постериорно-антериорна радиографија плућа и срца, ехотомографија трбуха, компјутеризована томографија грудног коша и трбуха, бронхоскопија, а по потреби и друге дијагностичке процедуре са циљем одређивања стадијума болести (позитронска емисиона томографија, сцинтиграфија костију, компјутеризована

томографија или магнетна резонанца главе, плеурална пункција, пункција перикарда са цитолошким прегледом узетог материјала), у складу са Националним водичем добре клиничке праксе за карцином плућа.

Патохистолошком анализом тумора праћен је хистолошки тип тумора.

Хистолошка верификација анализе туморског ткива обухватила је стандардну методу бојења препарата хематоксилин-еозин бојењем, као и хистохемијска и имунохистохемијска бојења која су важан елемент одређивања хистолошког типа и градуса болести.

Зависне варијабле:

Процентуална заступљеност *MDSC* унутар леукоцита: *MDSC* је одређивана коришћењем моноклонских антитела за имунофенотипизацију, специфичних према ћелијским површинским маркерима *CD3*, *CD10*, *CD11b*, *CD14*, *CD15*, *CD16*, *CD19*, *CD33*, *CD66*, *CD4* и *HLA-DR*, у различитим комбинацијама за мултиколорну анализу. Обојене ћелије су анализирале на *Beckman Coulter FC 500* проточном цитометру помоћу *CXP analysis* програма. Процентуална заступљеност *MDSC* је изражена као проценат од укупних леукоцита.

Степен испољености *CD16* на *MDSC* и зрелим гранулоцитима: На *MDSC* и популацији зрелих гранулоцита процењена је експресија *CD16* молекула, као и средња вредности интензитета флуоресценце (*MFI, mean fluorescence intensity*) *CD16* молекула на испитиваним ћелијама.

Добијени резултати одређивања зависних варијабли поређени су према хистолошком типу тумора, величини тумора, нодалном статусу и клиничком стадијуму болести.

## Д. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Сви статистички прорачуни су урађени коришћењем *GraphPad Prism 5 version 5.01* софтвера. Независни узорци су поређени између група коришћењем Студентовог *t*-теста и *Mann-Whitney* теста. За зависне узорке са више од две групе коришћен је *One-way ANOVA* тест са накнадним *Bonferroni* тестом. За процену статистичке повезаности међу различитим параметрима коришћени су *Pearson*-ов и *Spearman*-ов тест корелације. Разлике су сматране статистички значајним уколико је *p* мање или једнако 0,05, високо значајним уколико је *p* мање или једнако 0,001 и веома високо статистички значајним уколико је *p* мање или једнако 0,0001. Статистичке разлике које нису биле значајне означене су као *ns* (*not significant*). Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација ( $X \pm SD$ ), али и као минимална и максимална вредност (*Min-Max*), медијана (*Med*) и стандардна грешка (*SE*).

#### 4. РЕЗУЛТАТИ

Студија је урађена на узорку од укупно 64 испитаника, односно 54 пацијента са дијагностикованим тумором плућа и 10 здравих особа (контролна група). Код пацијената је праћен патохистолошки тип тумора плућа, *T* стадијум, *N* стадијум болести, присуство метастаза и клинички стадијум болести. У зависности од ових параметара урађена је анализа вредности праћених маркера код пацијената са тумором плућа према месту узимања узорка крви: из системске циркулације или микроциркулације тумора (Табела 1).

Табела 1. Основне клиничке карактеристике пацијената

	Број пацијената	Укупно
Патохистолошки тип		
<i>SCLC</i>	10	44
<i>Ad</i>	10	
<i>Sq</i>	18	
<i>LC</i>	6	
<i>T</i> стадијум		
<i>T1</i>	11	48
<i>T2</i>	14	
<i>T3</i>	14	
<i>T4</i>	9	
<i>N</i> стадијум		
<i>N0</i>	11	44
<i>N1</i>	10	
<i>N2</i>	13	
<i>N3</i>	10	
Присуство метастаза		
<i>M0</i>	27	44
<i>M1</i>	17	
Клинички стадијум		
III	27	43
IV	16	

#### 4.1. Заступљеност *MDSC* у различитим узорцима контролне групе и оболелих пацијената

##### Вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора

Анализа *CD14<sup>+</sup> MDSC* је показала да су највеће просечне вредности ових ћелија детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $26,02 \pm 15,96\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $15,46 \pm 8,24\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $3,20 \pm 1,32\%$ ) биле мање (Табела 2).

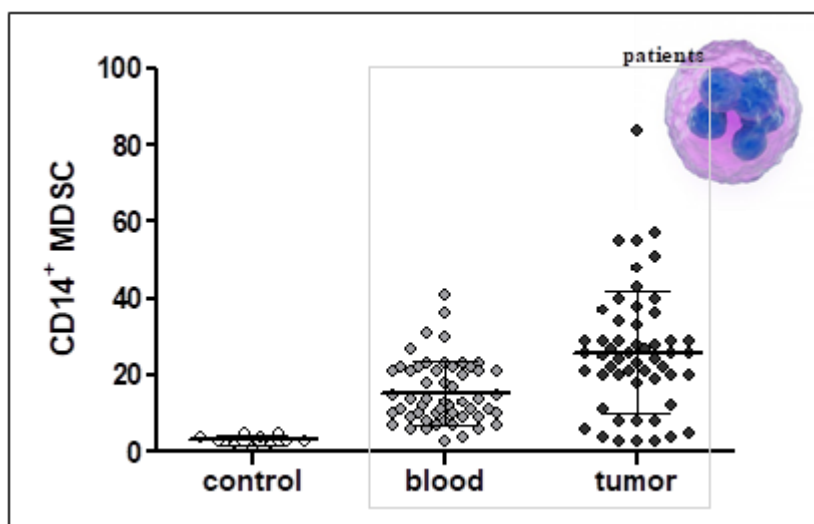
Табела 2. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора

<i>CD14<sup>+</sup> MDSC</i>	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	1,00	3,00	3,00
<i>Max</i>	5,00	41,00	84,00
<i>Med</i>	3,00	13,50	25,50
<i>SE</i>	0,42	1,12	2,17
<i>X</i>	3,20	15,46	26,02
<i>SD</i>	1,32	8,24	15,96

Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* биле су статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ) (График 1). Такође, статистички значајно виша вредност ових ћелија је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ). Ако се узорци из системске циркулације и узорци из

микроциркулације тумора истих пацијената упаре и анализирају статистичким тестом за везане узорке, онда се такође добија статистички значајна разлика (*Wilcoxon test*;  $p = 0,0003$ ).

График 1. Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора



### Вредности $CD14^+B7H4^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора

Анализа  $CD14^+B7H4^+$  MDSC је показала да су највеће просечне вредности ових ћелија детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $24,72 \pm 18,77\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $6,11 \pm 6,25\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $1,80 \pm 0,92\%$ ) биле мање (Табела 3).

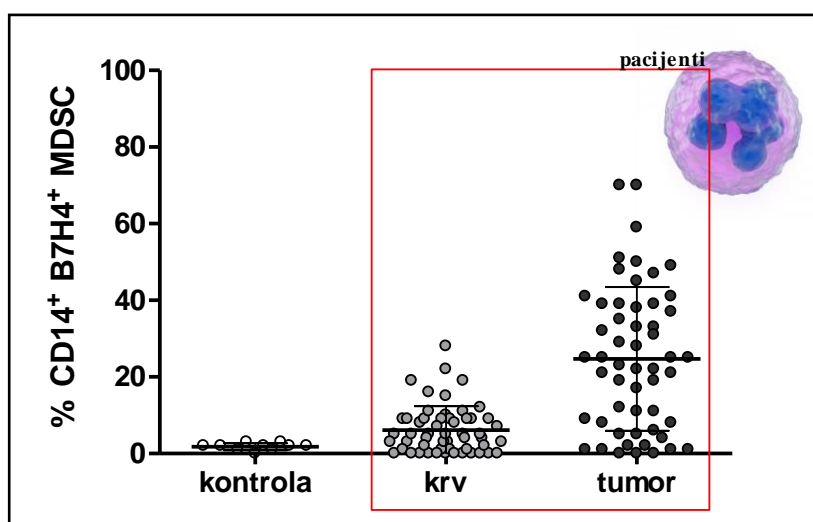


Табела 3. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	3,00	28,00	70,00
<i>Med</i>	2,00	5,00	24,00
<i>SE</i>	0,29	0,85	2,55
<i>X</i>	1,80	6,11	24,72
<i>SD</i>	0,92	6,25	18,77

Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC биле су статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0002$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0001$ ), а слично је добијено и упареном анализом (*Wilcoxon test*;  $p < 0,0001$ ) (График 2). Такође, статистички значајно виша вредност ових ћелија је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0417$ ).

График 2. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора



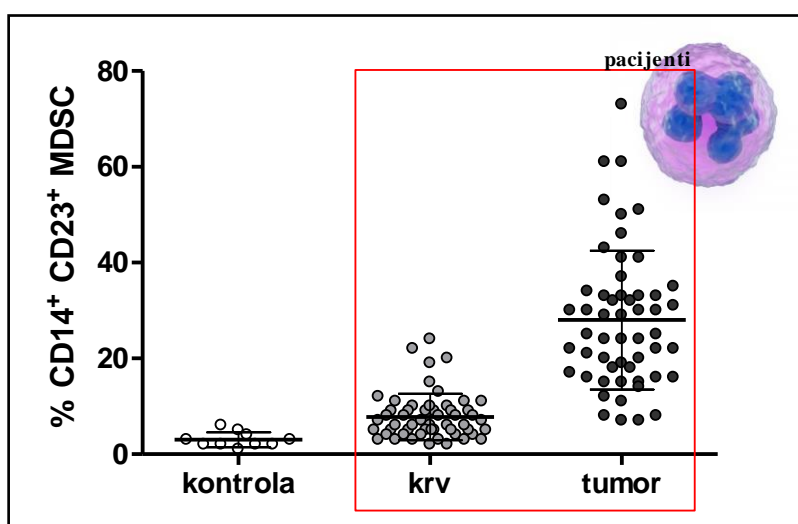
## Вредности $CD14^+CD23^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора

Анализа  $CD14^+CD23^+$  MDSC је показала да су највеће просечне вредности ових ћелија детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $28,00 \pm 14,52\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $7,78 \pm 4,87\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $3,00 \pm 1,56\%$ ) биле мање (Табела 4).

Табела 4. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	1,00	2,00	7,00
<i>Max</i>	6,00	24,00	73,00
<i>Med</i>	2,50	6,50	25,00
<i>SE</i>	0,49	0,66	1,98
<i>X</i>	3,00	7,78	28,00
<i>SD</i>	1,56	4,87	14,52

График 3. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора



Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC биле су статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), а слично је добијено и упареном анализом (*Wilcoxon test*;  $p < 0,0001$ ) (График 3). Такође, статистички значајно виша вредност ових ћелија је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0002$ ).

#### **Вредности $CD23^+B7H4^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора**

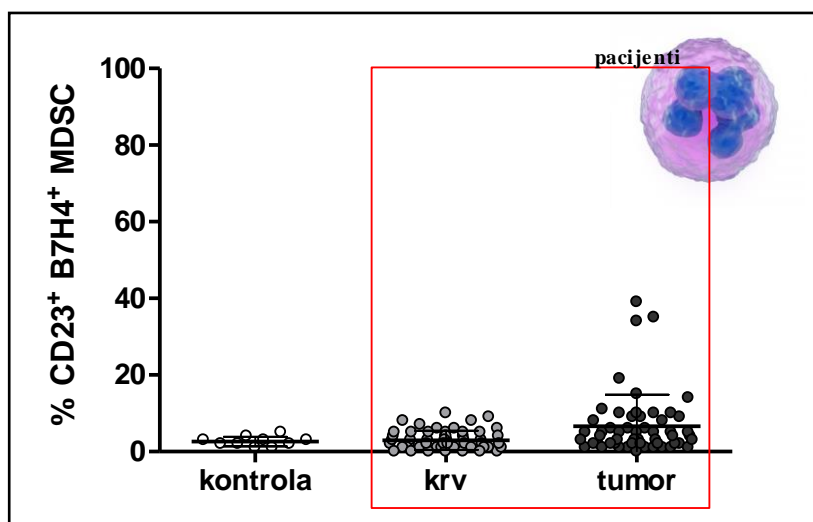
Анализа  $CD23^+B7H4^+$  MDSC је показала да су највеће просечне вредности ових ћелија детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $6,67 \pm 8,25\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $2,96 \pm 2,50\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $2,60 \pm 1,27\%$ ), биле мање (Табела 5).

Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC биле су статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0030$ ), а слични резултати су добијени и упареном анализом (*Wilcoxon test*;  $p < 0,0001$ ) (График 4). Такође, статистички значајно виша вредност ових ћелија је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0003$ ).

Табела 5. Просечне вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора

$CD23^{+}B7H4^{+}$ MDSC	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	1,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	5,00	10,00	39,00
<i>Med</i>	2,50	2,00	4,00
<i>SE</i>	0,40	0,34	1,12
<i>X</i>	2,60	2,96	6,67
<i>SD</i>	1,27	2,50	8,25

График 4. Просечне вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора



#### 4.2. Патохистолошки тип тумора и MDSC

Вредности  $CD14^{+}$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора

Анализом  $CD14^{+}$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације у односу на патохистолошки тип тумора (ситноћелијски карцином плућа - SCLC;

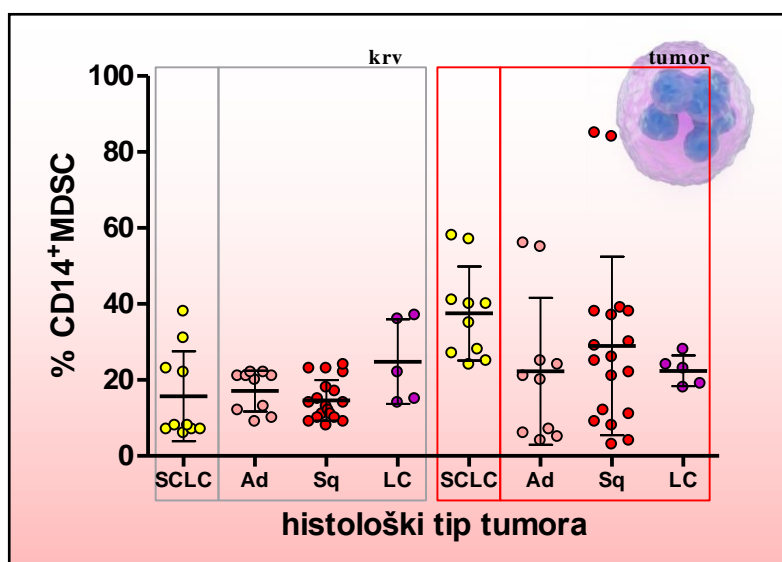
неситноћелијски карцином плућа - *NSCL*: аденокарцином - *Ad*, сквамозни плућни карцином - *Sq* и крупноћелијски карцином плућа - *LC*) показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *LC* ( $24,80 \pm 11,12\%$ ), а најмање у групи са *Sq* тумором (Табела 6; График 5). Међутим, највеће просечне вредности ових ћелија у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $37,22 \pm 13,06\%$ ), а најмање у групи са *Ad* тумором.

Табела 6. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора

<i>CD14<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	5	9	10	18	5
<i>Min</i>	6,00	9,00	8,00	14,00	24,00	4,00	3,00	18,00
<i>Max</i>	38,00	22,00	24,00	37,00	58,00	56,00	85,00	28,00
<i>Med</i>	8,00	20,50	13,50	22,00	35,00	20,50	25,50	23,00
<i>SE</i>	3,75	1,70	1,26	4,97	4,35	6,11	5,54	1,81
<i>X</i>	15,70	17,10	14,61	24,80	37,22	22,30	28,94	22,40
<i>SD</i>	11,85	5,38	5,35	11,12	13,06	19,31	23,49	4,04

Поређењем вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, уочава се да једино постоји статистички значајно виша вредност код *LC* у односу на *Sq* ( $24,80 \pm 11,12$ ;  $14,61 \pm 5,35$ , редом; *Mann Whitney test*,  $p = 0,0477$ ) (Табела 7). Ако се упореде вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви из микроциркулације тумора у зависности од патохистолошког типа тумора, проналази се статистички значајно виша просечна вредност ових ћелија код *SCLC* у односу на *Ad* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0171$ ), као и у *SCLC* у односу на *LC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0118$ ).

График 5. Просечне вредности  $CD14^{+}$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу



Табела 7. Упоредна анализа вредности  $CD14^{+}$  MDSC између група пацијената различитог патохистолошког типа тумора у системској циркулацији и микроциркулацији тумора плућа

$CD14^{+}$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0171$
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0118$
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	$p = 0,0477$	<i>ns</i>

Анализом вредности  $CD14^{+}$  MDSC код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност ових ћелија у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0022$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0138$ ), као и код *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0496$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0185$ ) (Табела 8).

Табела 8. Упоредна анализа вредности  $CD14^+ MDSC$  према патохистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>SCLC</i>	$p = 0,0022$	$p = 0,0138$
<i>NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq</i>	$p = 0,0496$	$p = 0,0185$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

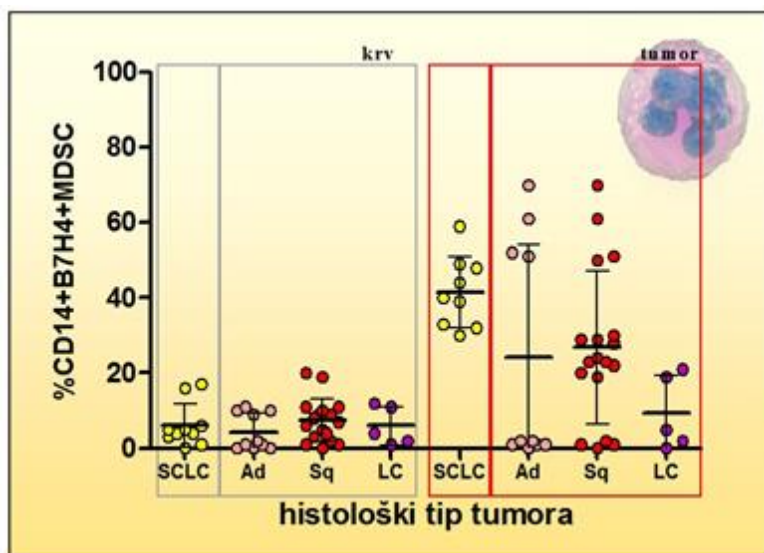
**Вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора**

Анализом  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на патохистолошки тип тумора, показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *Sq* ( $7,50 \pm 5,63\%$ ), а најмање у групи са *Ad* (Табела 9; График 6). Међутим, највеће просечне вредности ових ћелија у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $41,56 \pm 9,45\%$ ), а најмање у групи са *LC* тумором.

Табела 9. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу

$CD14^+B7H4^+ MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	5	10	10	18	5
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	30,00	0,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	17,00	11,00	20,00	12,00	59,00	70,00	70,00	21,00
<i>Med</i>	4,50	1,50	7,50	4,00	40,00	2,00	23,50	5,00
<i>SE</i>	1,83	1,54	1,33	2,30	3,15	9,50	4,79	4,41
<i>X</i>	6,10	4,40	7,50	6,00	41,56	24,10	26,83	9,40
<i>SD</i>	5,78	4,88	5,63	5,15	9,45	30,05	20,31	9,86

График 6. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу



Поређењем вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, није нађена статистички значајна разлика ни у једном патохистолошком подтипу тумора (Табела 10). Међутим, када се упореде вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из микроциркулације тумора у зависности од патохистолошког типа тумора, уочава се статистички значајно виша просечна вредност ових ћелија код SCLC у односу на Sq (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0180$ ), као и код SCLC у односу на LC (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0010$ ).

Анализом вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са SCLC (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0003$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0088$ ), код Sq (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0025$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0005$ ), као и код Ad (*Wilcoxon test*,  $p = 0,0213$ ) (Табела 11).



Табела 10. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог патохистолошког типа тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0180$
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0010$
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 11. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC према патохистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>SCLC</i>	$p = 0,0003$	$p = 0,0088$
<i>NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0213$
<i>NSCLC Sq</i>	$p = 0,0025$	$p = 0,0005$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

#### Вредности $CD14^+CD23^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора

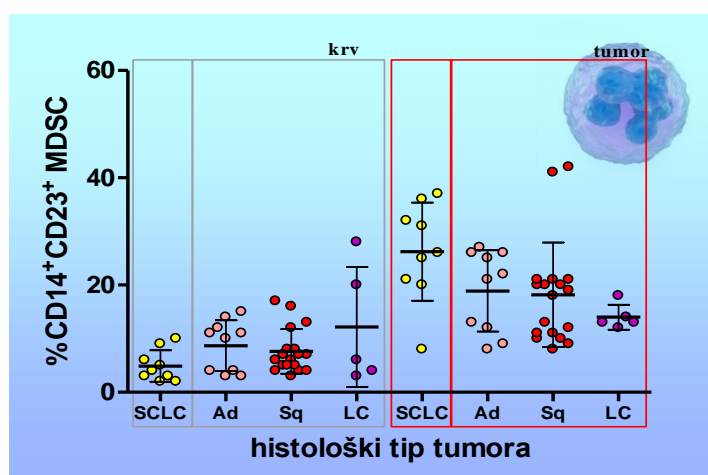
Анализом  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на патохистолошки тип тумора, показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *LC* ( $12,20 \pm 11,19\%$ ), а најмање у групи са *SCLC* (Табела 12; График 7). Међутим, највеће просечне вредности ових ћелија у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $26,22 \pm 9,14\%$ ), а најмање у групи са *LC* тумором.

Поређењем вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, није нађена статистички значајна разлика ни у једном патохистолошком подтипу тумора (Табела 13). Међутим, ако се упореде вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви из микроциркулације тумора у зависности од патохистолошког типа тумора, уочава се статистички значајно виша просечна вредност код *SCLC* у односу на *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0344$ ), као и код *SCLC* у односу на *LC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0190$ ).

Табела 12. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	5	10	10	18	5
<i>Min</i>	2,00	3,00	3,00	3,00	8,00	8,00	8,00	12,00
<i>Max</i>	10,00	15,00	17,00	28,00	37,00	27,00	42,00	18,00
<i>Med</i>	4,00	10,50	6,50	6,00	26,00	21,50	18,50	13,00
<i>SE</i>	0,98	1,49	0,98	5,00	3,05	2,40	2,30	1,05
<i>X</i>	4,89	8,70	7,61	12,20	26,22	18,90	18,17	14,00
<i>SD</i>	2,93	4,72	4,16	11,19	9,14	7,58	9,74	2,35

График 7. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу



Табела 13. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника различитог патохистолошког типа тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0344$
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0190$
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Анализом вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, уочена је статистички значајно виша вредност ових ћелија у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (Mann Whitney test,  $p = 0,0008$ ; Wilcoxon test,  $p = 0,0139$ ), код *Sq* (Mann Whitney test,  $p < 0,0001$ ; Wilcoxon test,  $p = 0,0002$ ), као и код *Ad* (Mann Whitney test,  $p = 0,0125$ ; Wilcoxon test,  $p = 0,0239$ ) (Табела 14).

Табела 14. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC према хистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	Mann Whitney test	Wilcoxon test
<i>SCLC</i>	$p = 0,0008$	$p = 0,0139$
<i>NSCLC Ad</i>	$p = 0,0125$	$p = 0,0239$
<i>NSCLC Sq</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0002$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

**Вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу тумора**

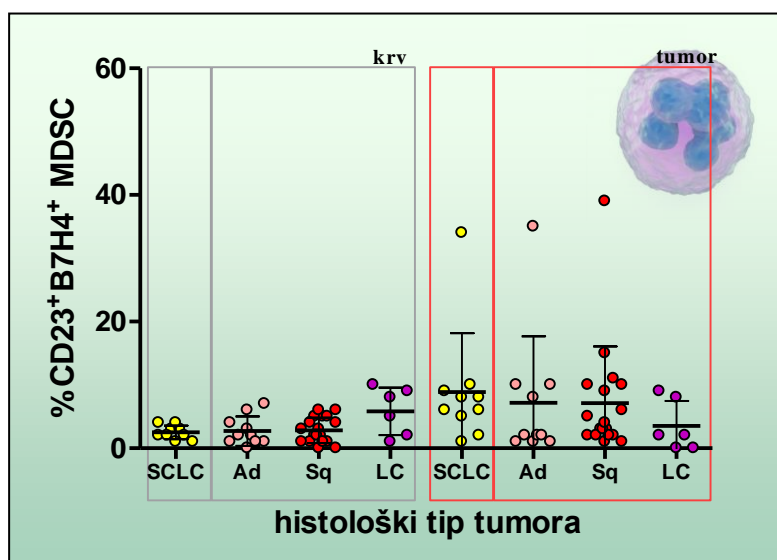
Анализом  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на патохистолошки тип тумора, показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *LC* ( $5,83 \pm 3,76\%$ ) а најмање у групи са *SCLC* (Табела 15; График 8). Међутим, највеће просечне вредности ових ћелија у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $8,90 \pm 9,28\%$ ), а најмање у групи са *LC* тумором.

Табела 15. Просечне вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу

$CD23^{+}B7H4^{+}$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	6	10	10	18	6
<i>Min</i>	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<i>Max</i>	4,00	7,00	6,00	10,00	34,00	35,00	39,00	9,00
<i>Med</i>	2,50	2,00	2,50	6,50	7,00	2,00	3,50	2,00
<i>SE</i>	0,34	0,73	0,47	1,54	2,93	3,31	2,11	1,63
<i>X</i>	2,50	2,70	2,83	5,83	8,90	7,20	7,11	3,50
<i>SD</i>	1,08	2,31	2,01	3,76	9,28	10,46	8,94	3,99

Поређењем вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, није нађена статистички значајна разлика ни у једном патохистолошком подтипу тумора (Табела 16), а слични резултати су добијени и у узорцима из микроциркулације тумора плућа.

График 8. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу



Табела 16. Статистичка анализа вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог патохистолошког типа тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD23^+ B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Анализом вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0096$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0137$ ), код *Sq* (*Wilcoxon test*,  $p = 0,0081$ ), као и код *Ad* (*Wilcoxon test*,  $p = 0,0355$ ) (Табела 17).

Табела 17. Статистичка анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према патохистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>SCLC</i>	$p = 0,0096$	$p = 0,0137$
<i>NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0355$
<i>NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0081$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

### 4.3. Величина тумора и MDSC

#### Вредности $CD14^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора (*T* стадијум)

Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и у узорцима микроциркулације туморског ткива код 10 пацијената са тумором у *T1* стадијуму, 14 са тумором у *T2*, 14 са тумором у *T3* и 8 пацијената са тумором у *T4* стадијуму. У узорцима крви оболелих од тумора плућа, како из системске циркулације, тако и из микроциркулације туморског ткива, највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у *T4* стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у *T1* стадијуму (Табела 18, График 9).

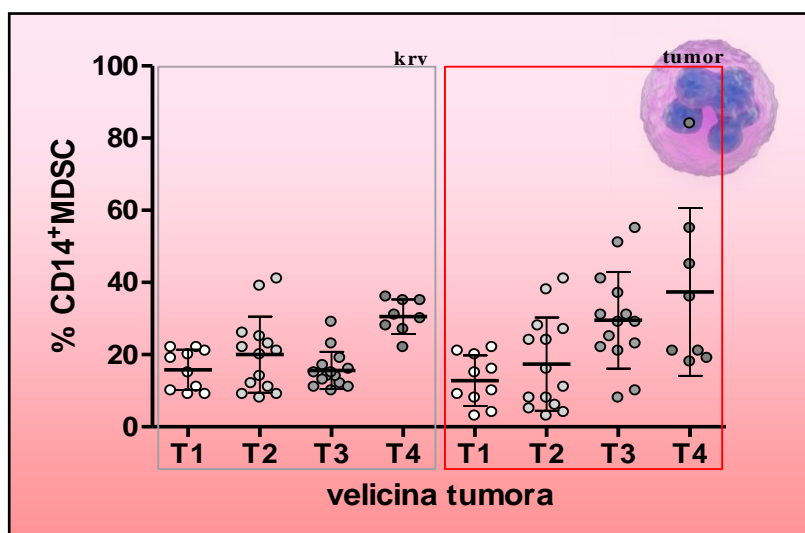
Поређењем вредности  $CD14^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *T* стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената у *T4* стадијуму у односу на остала три стадијума (*T1-3*) (Табела 19). Међутим, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија

у групи пацијената у  $T4$  стадијуму у односу на  $T1$  и  $T2$ , као и у  $T3$  у односу на  $T1$  и  $T2$  стадијум.

Табела 18. Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

$CD14^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$
<i>N</i>	10	14	14	8	10	14	14	8
<i>Min</i>	9,00	8,00	10,00	22,00	3,00	3,00	8,00	18,00
<i>Max</i>	22,00	41,00	29,00	36,00	22,00	41,00	55,00	84,00
<i>Med</i>	17,00	20,50	14,50	30,50	12,50	13,50	29,00	28,50
<i>SE</i>	1,77	2,82	1,38	1,70	2,21	3,45	3,59	8,23
<i>X</i>	15,80	20,00	15,64	30,50	12,80	17,36	29,50	37,38
<i>SD</i>	5,59	10,54	5,17	4,81	6,97	12,90	13,41	23,28

График 9. Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Анализом вредности  $CD14^+$  MDSC код пацијената са различитим  $T$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, уочава се статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке

из системске циркулације код пацијената са *T3* стадијумом (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0040$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0120$ ) (Табела 20).

Табела 19. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup>MDSC* између група болесника различите величине тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора плућа

<i>CD14<sup>+</sup>MDSC</i>	Крв	Микроциркулација тумора
<i>T1 / T2</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>T1 / T3</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0014$
<i>T1 / T4</i>	$p = 0,0006$	$p = 0,0066$
<i>T2 / T3</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0273$
<i>T2 / T4</i>	$p = 0,0140$	$p = 0,0440$
<i>T3 / T4</i>	$p = 0,0004$	<i>ns</i>

Табела 20. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup>MDSC* према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>T1</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>T2</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>T3</b>	$p = 0,0040$	$p = 0,0120$
<b>T4</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

#### Вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC* у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

Просечне вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC* такође су одређене у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у *T3* стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у *T1* стадијуму (Табела 21, График 10). У



узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у *T3* и *T2* стадијуму, а најмање такође код пацијената у *T1* стадијуму.

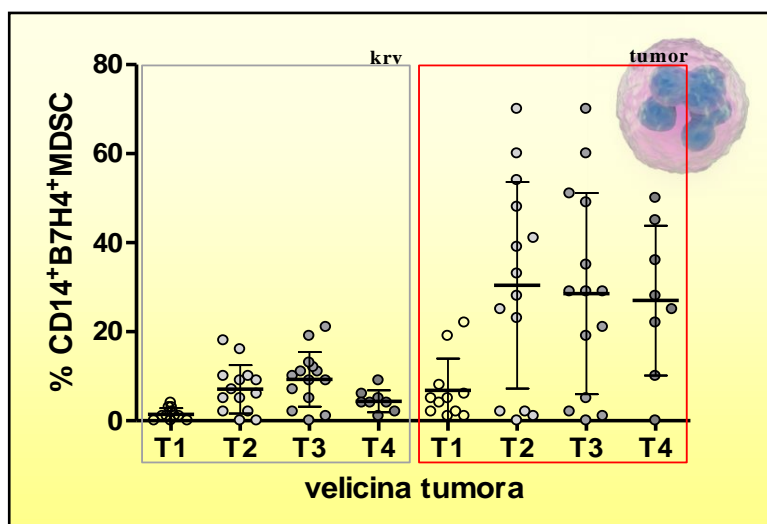
Поређењем вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *T* стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената у *T2-4* стадијуму у односу на *T1*, као и у *T3* у односу на *T4* (*Mann Whitney test*) (Табела 22). Слично, и у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групама пацијената у *T2-4* стадијуму у односу на *T1*.

Анализом вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC* код пацијената са различитим *T* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим *T* стадијумом (Табела 23).

Табела 21. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

<i>CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>
<i>N</i>	11	14	14	8	11	14	14	8
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	4,00	18,00	21,00	9,00	22,00	70,00	70,00	50,00
<i>Med</i>	1,00	6,50	9,50	4,00	5,00	30,50	29,00	26,50
<i>SE</i>	0,41	1,45	1,64	0,86	2,15	6,20	6,05	5,95
<i>X</i>	1,46	7,07	9,29	4,38	6,82	30,43	28,57	27,00
<i>SD</i>	1,37	5,44	6,15	2,45	7,14	23,20	22,62	16,83

График 10. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 22. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различите величине тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<b>T1 / T2</b>	$p = 0,0054$	$p = 0,0301$
<b>T1 / T3</b>	$p = 0,0015$	$p = 0,0281$
<b>T1 / T4</b>	$p = 0,0064$	$p = 0,0131$
<b>T2 / T3</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>T2 / T4</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>T3 / T4</b>	$p = 0,0473$	<i>ns</i>

Табела 23. Статистичка анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>T1</b>	$p = 0,0238$	$p = 0,0089$
<b>T2</b>	$p = 0,0011$	$p = 0,0038$
<b>T3</b>	$p = 0,0049$	$p = 0,0037$
<b>T4</b>	$p = 0,0021$	$p = 0,0156$

**Вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора**

Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC одређене су и у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у  $T3$  стадијуму ( $8,71 \pm 2,76\%$ ), а најмање код пацијената са тумором у  $T1$  стадијуму (Табела 24, График 11). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у  $T4$  стадијуму ( $37,50 \pm 20,26\%$ ), а најмање такође код пацијената у  $T1$  стадијуму.

Табела 24. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

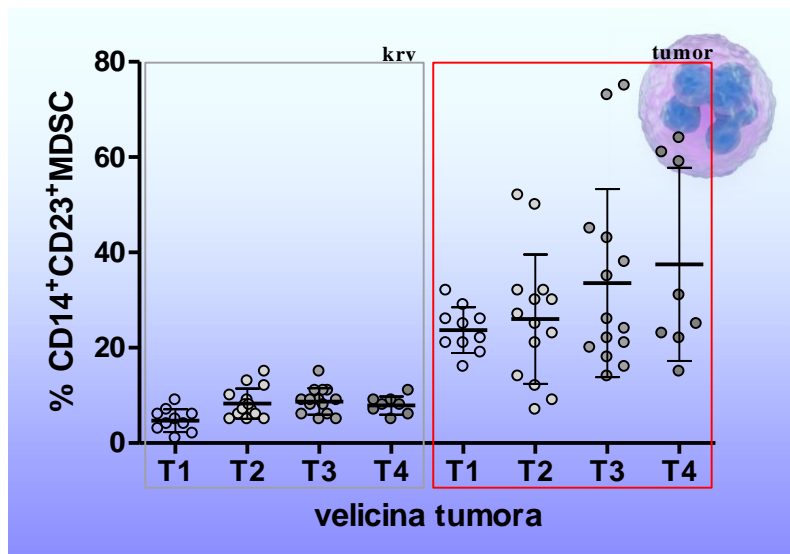
$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$
<i>N</i>	10	14	14	8	10	14	14	8
<i>Min</i>	1,00	5,00	5,00	5,00	16,00	7,00	14,00	15,00
<i>Max</i>	9,00	15,00	15,00	11,00	32,00	52,00	75,00	64,00
<i>Med</i>	4,50	7,50	9,00	8,00	23,50	26,00	25,00	28,00
<i>SE</i>	0,76	0,85	0,74	0,67	1,52	3,62	5,28	7,16
<i>X</i>	4,70	8,29	8,71	7,88	23,70	26,00	33,57	37,50
<i>SD</i>	2,41	3,17	2,76	1,89	4,81	13,54	19,75	20,26

Поређењем вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $T$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групама пацијената у  $T2-4$  стадијуму у односу на  $T1$  (*Mann Whitney test*) (Табела 25). Међутим, у узорцима

крви из микроциркулације тумора није нађена статистички значајно већа вредност ових ћелија између *T* група, иако је највећа вредност била у *T4* стадијуму.

Анализом вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC код пацијената са различитим *T* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, уочена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим *T* стадијумом (Табела 26).

График 11. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 25. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника различите величине тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>T1 / T2</i>	$p = 0,0088$	<i>ns</i>
<i>T1 / T3</i>	$p = 0,0029$	<i>ns</i>
<i>T1 / T4</i>	$p = 0,0140$	<i>ns</i>
<i>T2 / T3</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>T2 / T4</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>T3 / T4</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 26. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>T1</i>	$p = 0,0002$	$p = 0,0058$
<i>T2</i>	$p = 0,0002$	$p = 0,0011$
<i>T3</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0011$
<i>T4</i>	$p = 0,0009$	$p = 0,0140$

**Вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора**

Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у *T3* стадијуму ( $4,07 \pm 3,17\%$ ), а најмање код пацијената са тумором у *T1* стадијуму (Табела 27, График 12). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у *T4* стадијуму ( $22,11 \pm 12,47\%$ ), а најмање такође код пацијената у *T1* стадијуму.

Поређењем вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *T* стадијума тумора, уочена је статистички значајно већа вредност у групама пацијената у *T2* и *T3* стадијуму у односу на *T1* (*Mann Whitney test*) (Табела 28). Међутим, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената са *T4* стадијумом у односу на *T1* и *T2*.

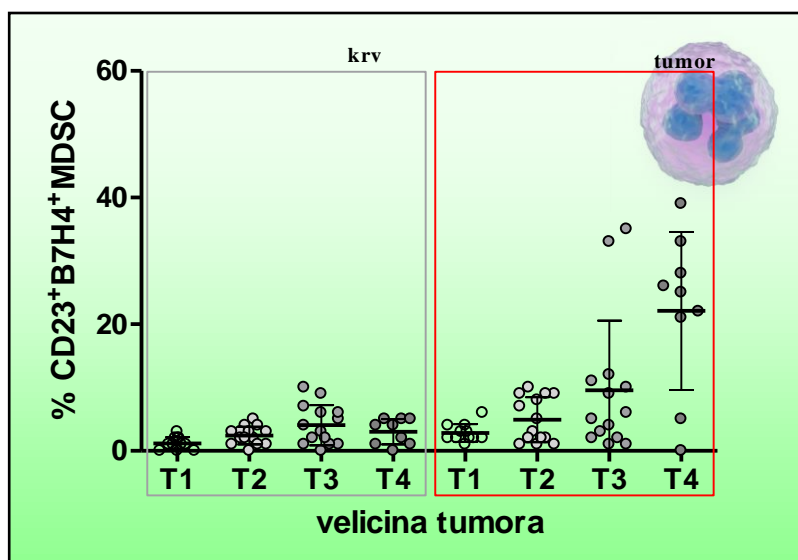
Анализом вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим *T* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички

значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим *T* стадијумом (Табела 29).

Табела 27. Просечне вредности  $CD23^{+}B7H4^{+} MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

$CD23^{+}B7H4^{+} MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>
<i>N</i>	11	14	14	9	11	14	14	9
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<i>Max</i>	3,00	5,00	10,00	5,00	6,00	10,00	35,00	39,00
<i>Med</i>	1,00	2,50	3,50	4,00	2,00	4,00	5,50	25,00
<i>SE</i>	0,30	0,37	0,85	0,67	0,42	0,95	2,94	4,16
<i>X</i>	1,18	2,43	4,07	3,00	2,82	4,93	9,57	22,11
<i>SD</i>	0,98	1,40	3,17	2,00	1,40	3,56	11,00	12,47

График 12. Просечне вредности  $CD23^{+}B7H4^{+} MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 28. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различите величине тумора у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
$T1 / T2$	$p = 0,0268$	<i>ns</i>
$T1 / T3$	$p = 0,0154$	<i>ns</i>
$T1 / T4$	<i>ns</i>	$p = 0,0086$
$T2 / T3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$T2 / T4$	<i>ns</i>	$p = 0,0080$
$T3 / T4$	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 29. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$T1$	$p = 0,0060$	$p = 0,0215$
$T2$	<i>ns</i>	$p = 0,0159$
$T3$	<i>ns</i>	$p = 0,0321$
$T4$	$p = 0,0077$	$p = 0,0078$

#### 4.4. Нодални статус и MDSC

#### Вредности $CD14^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су анализирани у односу на нодални ( $N$ ) стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у  $N1$  стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у  $N0$  стадијуму (Табела 30, График 13). У узорцима крви из микроциркулације тумора

највеће вредности ових ћелија су такође детектоване код пацијената са тумором у *N1* стадијуму, а најмање такође код пацијената у *N0* стадијуму.

Поређењем вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *N* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између различитих *N* стадијума пацијената (*Mann Whitney test*) (Табела 31). Међутим, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената са *N1* и *N3* стадијумима у односу на *N0* стадијум болести.

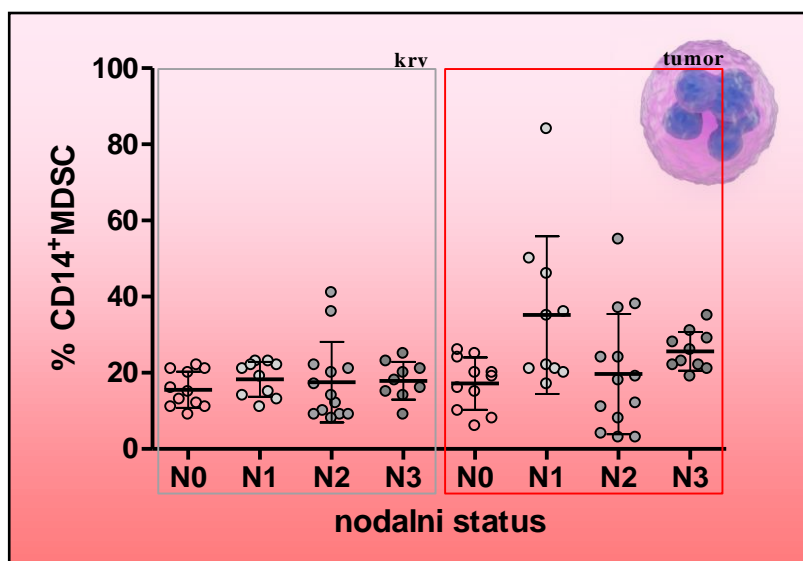
Табела 30. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

<i>CD14<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	9,00	11,00	8,00	9,00	6,00	17,00	3,00	19,00
<i>Max</i>	22,00	23,00	41,00	25,00	26,00	84,00	55,00	35,00
<i>Med</i>	15,00	20,00	14,00	18,00	19,00	28,50	18,00	24,50
<i>SE</i>	1,43	1,45	2,93	1,65	2,07	6,55	4,38	1,61
<i>X</i>	15,55	18,30	17,54	17,89	17,18	35,20	19,69	25,60
<i>SD</i>	4,74	4,60	10,56	4,96	6,87	20,70	15,80	5,08

Анализом вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* код пацијената са различитим *N* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *N1* и *N3* стадијумима болести (Табела 32).



График 13. Просечне вредности  $CD14^{+} MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Табела 31. Упоредна анализа вредности  $CD14^{+} MDSC$  између група болесника различитог нодалног статуса у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора плућа

$CD14^{+}MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	$p = 0,0123$
$N0 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N0 / N3$	<i>ns</i>	$p = 0,0101$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N2 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 32. Статистичка анализа вредности  $CD14^{+} MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$N0$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1$	$p = 0,0444$	$p = 0,0248$
$N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N3$	$p = 0,0079$	$p = 0,0195$

**Вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу**

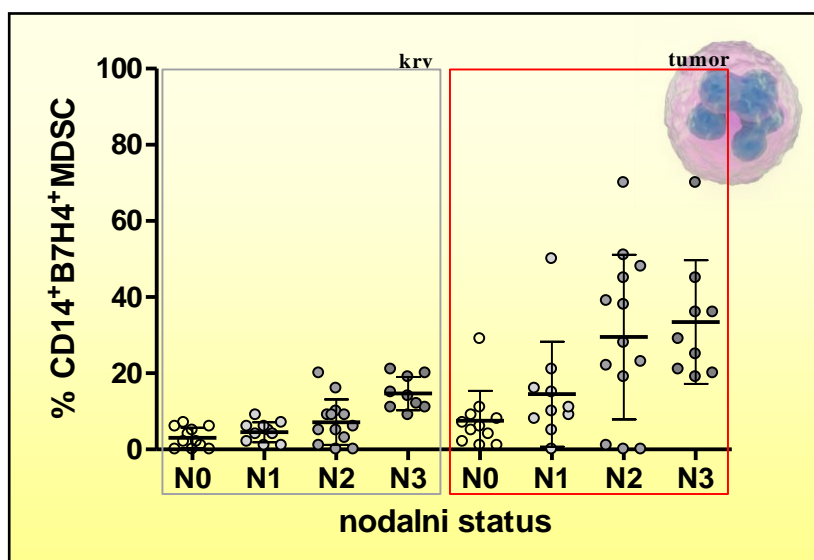
У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC су детектоване код пацијената са тумором у  $N3$  стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у  $N0$  стадијуму (Табела 33, График 14). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности ових ћелија су такође детектоване код пацијената са тумором у  $N3$  стадијуму, а најмање такође код пацијената у  $N0$  стадијуму.

Поређењем вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $N$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност у  $N3$  стадијуму у односу на остала три  $N$  стадијума ( $N0-2$ ) (*Mann Whitney test*) (Табела 34). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената са  $N3$  стадијумом у односу на  $N0$  и  $N1$ , као и у  $N2$  у односу на  $N0$  стадијум болести.

Табела 33. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	$N0$	$N1$	$N2$	$N3$	$N0$	$N1$	$N2$	$N3$
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	0,00	1,00	0,00	9,00	1,00	0,00	0,00	19,00
<i>Max</i>	7,00	9,00	20,00	21,00	29,00	50,00	70,00	70,00
<i>Med</i>	2,00	4,50	6,00	14,00	6,00	10,50	28,00	29,00
<i>SE</i>	0,81	0,83	1,66	1,46	2,36	4,36	6,00	5,42
<i>X</i>	3,00	4,50	7,15	14,67	7,55	14,50	29,54	33,44
<i>SD</i>	2,68	2,64	5,98	4,39	7,83	13,79	21,62	16,27

График 14. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Анализом вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим  $N$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим  $N$  стадијумом болести (Табела 35).

Табела 34. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог нодалног статуса у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N0 / N2$	<i>ns</i>	$p = 0,0424$
$N0 / N3$	$p = 0,0002$	$p = 0,0007$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1 / N3$	$p = 0,0003$	$p = 0,0055$
$N2 / N3$	$p = 0,0049$	<i>ns</i>

Табела 35. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>N0</b>	$p = 0,0362$	<i>ns</i>
<b>N1</b>	$p = 0,0141$	$p = 0,0112$
<b>N2</b>	$p = 0,0037$	$p = 0,0126$
<b>N3</b>	$p = 0,0091$	$p = 0,0017$

**Вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу**

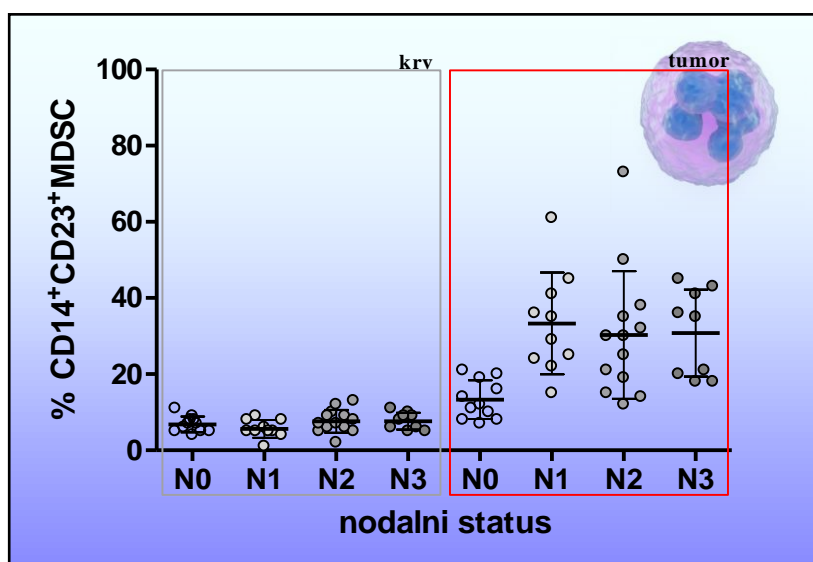
У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће просечне вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  су детектоване код пацијената са тумором у *N3* стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у *N1* стадијуму (Табела 36, График 15). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената са тумором у *N1* стадијуму, а најмање код пацијената у *N0* стадијуму.

Поређењем вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *N* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између вредности ових ћелија у различитим *N* стадијумима болести (*Mann Whitney test*) (Табела 37). Међутим, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групама пацијената са *N1-3* стадијумима у односу на *N0* стадијум болести.

Табела 36. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

$CD14^+CD23^+ MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	4,00	1,00	2,00	5,00	7,00	15,00	12,00	18,00
<i>Max</i>	11,00	9,00	13,00	11,00	21,00	61,00	73,00	45,00
<i>Med</i>	7,00	5,00	7,00	8,00	12,00	32,00	30,00	35,00
<i>SE</i>	0,63	0,73	0,84	0,75	1,53	4,23	4,65	3,80
<i>X</i>	6,82	5,60	7,62	7,67	13,27	33,30	30,31	30,78
<i>SD</i>	2,09	2,32	3,02	2,24	5,08	13,38	16,76	11,40

График 15. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Анализом вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  код пацијената са различитим *N* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим *N* стадијумом болести (Табела 38).

Табела 37. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  између група болесника различитог нодалног статуса у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+ MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	$p = 0,0004$
$N0 / N2$	<i>ns</i>	$p = 0,0017$
$N0 / N3$	<i>ns</i>	$p = 0,0018$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N2 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 38. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$N0$	$p = 0,0017$	$p = 0,0086$
$N1$	$p = 0,0002$	$p = 0,0059$
$N2$	$p < 0,0001$	$p = 0,0017$
$N3$	$p = 0,0004$	$p = 0,0039$

#### Вредности $CD23^+B7H4^+ MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће просечне вредности  $CD23^+B7H4^+ MDSC$  су детектоване код пацијената са тумором у  $N2$  стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у  $N0$  стадијуму (Табела 39, График 16). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности ових ћелија су такође детектоване код пацијената са тумором у  $N2$  стадијуму, а најмање такође код пацијената у  $N0$  стадијуму.

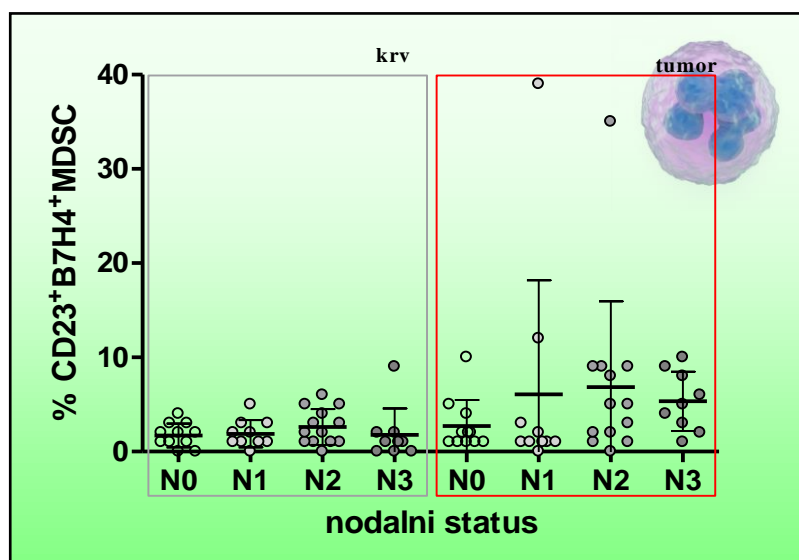
Поређењем вредности  $CD23^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $N$  стадијума тумора, није

нађена статистички значајна разлика у различитим  $N$  стадијумима болести (*Mann Whitney test*) (Табела 40). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је једино статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената са  $N3$  стадијумом у односу на  $N0$  стадијум болести.

Табела 39. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	$N0$	$N1$	$N2$	$N3$	$N0$	$N1$	$N2$	$N3$
$N$	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	4,00	5,00	6,00	9,00	10,00	39,00	35,00	10,00
<i>Med</i>	2,00	1,50	2,00	1,00	2,00	1,00	5,00	5,00
<i>SE</i>	0,38	0,46	0,53	0,94	0,83	3,82	2,52	1,05
$\bar{X}$	1,73	1,90	2,62	1,78	2,73	6,10	6,85	5,33
<i>SD</i>	1,27	1,45	1,90	2,82	2,76	12,07	9,09	3,16

График 16. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Анализом вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим  $N$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, уочена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са  $N2$  и  $N3$  стадијумом болести (Табела 41).

Табела 40. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог нодалног статуса у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N0 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N0 / N3$	<i>ns</i>	$p = 0,0485$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N2 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 41. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$N0$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N2$	<i>ns</i>	$p = 0,0220$
$N3$	$p = 0,0125$	$p = 0,0164$

#### 4.5. Постојање метастаза и MDSC

#### Вредности $CD14^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су



анализиране у односу на постојање метастаза - *M* стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената без метастаза (*M0*) у односу на пацијенате са метастазама (*M1*) (Табела 42, График 17). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође су веће вредности ових ћелија детектоване код пацијената без метастаза.

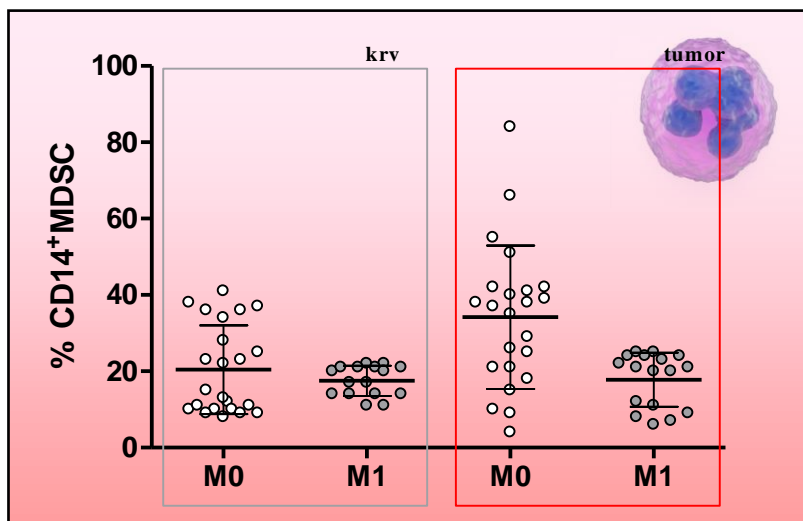
Поређењем вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *M* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између *M0* и *M1* стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 43). Међутим, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената без метастаза у односу на групу са *M1* стадијум болести.

Анализом вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* код пацијената са различитим *M* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност ових ћелија у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената без метастаза (Табела 44).

Табела 42. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

<i>CD14<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв		Микроциркулација тумора	
	<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M0</i>	<i>M1</i>
<i>N</i>	27	17	27	17
<i>Min</i>	8,00	11,00	4,00	6,00
<i>Max</i>	41,00	22,00	84,00	25,00
<i>Med</i>	15,00	18,50	37,00	21,00
<i>SE</i>	2,43	0,99	3,92	1,72
<i>X</i>	20,43	17,50	34,17	17,76
<i>SD</i>	11,63	3,97	18,78	7,09

График 17. Просечне вредности  $CD14^+ MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Табела 43. Упоредна анализа вредности  $CD14^+ MDSC$  између група болесника без и са метастазама у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора плућа

$CD14^+ MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
<i>M0 / M1</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0021$

Табела 44. Упоредна анализа вредности  $CD14^+ MDSC$  према постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>M0</b>	$p = 0,0060$	$p = 0,0021$
<b>M1</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  су детектоване код пацијената без метастаза (*M0*) у

односу на пацијенате са метастазама (*MI*) (Табела 45, График 18). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође су веће вредности ових ћелија детектоване код пацијената без метастаза.

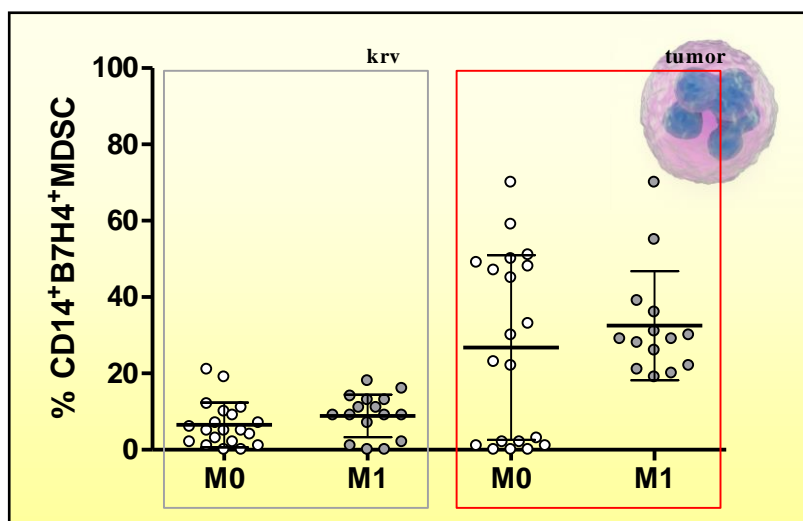
Поређењем вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *M* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика вредности ових ћелија између *M0* и *M1* стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 46). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика вредности ових ћелија између група пацијената без метастаза и са њима.

Табела 45. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

<i>CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв		Микроциркулација тумора	
	<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M0</i>	<i>M1</i>
<i>N</i>	26	17	27	17
<i>Min</i>	8,00	11,00	4,00	6,00
<i>Max</i>	41,00	22,00	84,00	25,00
<i>Med</i>	15,00	18,50	37,00	21,00
<i>SE</i>	2,43	0,99	3,92	1,72
<i>X</i>	20,43	17,50	34,17	17,76
<i>SD</i>	11,63	3,97	18,78	7,09

Анализом вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC* код пацијената са различитим *M* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације и код пацијената без метастаза и код пацијената са метастазама (Табела 47).

График 18. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Табела 46. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника са и без метастаза у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>M0 / M1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 47. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC према постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>M0</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0028$
<i>M1</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0025$

**Вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза**

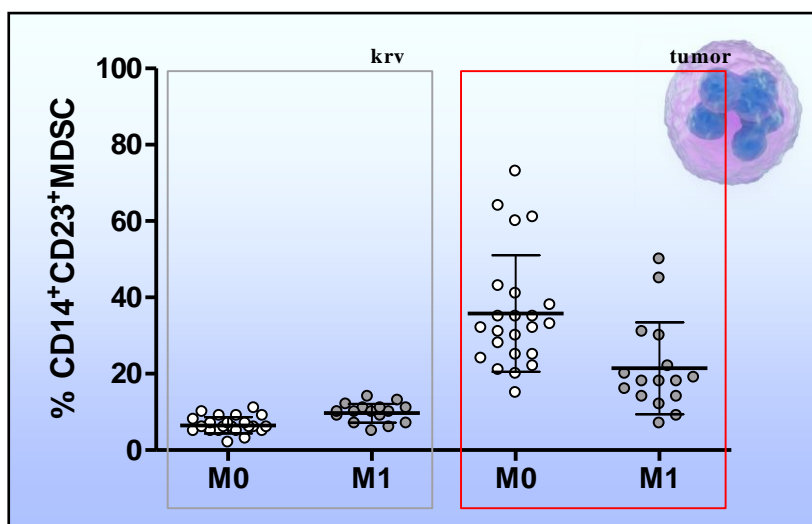
У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC су детектоване код пацијената са метастазама (M1) у односу на пацијенате без метастаза (Табела 48, График 19). У узорцима крви из микроциркулације тумора ситуација је супротна, тако да су веће вредности ових ћелија детектоване код пацијената без метастаза у односу на оне са метастазама.

Поређењем вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $M$  стадијума тумора, уочена је статистички значајно већа вредност у  $M1$  стадијуму у односу на  $M0$  стадијум (*Mann Whitney test*) (Табела 49). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија у групи пацијената без метастаза у односу на групу са метастазама.

Табела 48. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

$CD14^+CD23^+MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	M0	M1	M0	M1
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	2,00	5,00	15,00	7,00
<i>Max</i>	11,00	14,00	73,00	50,00
<i>Med</i>	6,00	10,00	32,00	18,00
<i>SE</i>	0,44	0,62	3,18	3,01
<i>X</i>	6,48	9,69	35,78	21,44
<i>SD</i>	2,13	2,47	15,23	12,03

График 19. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Анализом вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC код пацијената са различитим  $M$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације и код пацијената без метастаза и код оних са метастазама (Табела 50).

Табела 49. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника са и без метастаза у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
$M0 / M1$	$p = 0,0004$	$p = 0,0008$

Табела 50. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC према постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$M0$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
$M1$	$p = 0,0002$	$p = 0,0005$

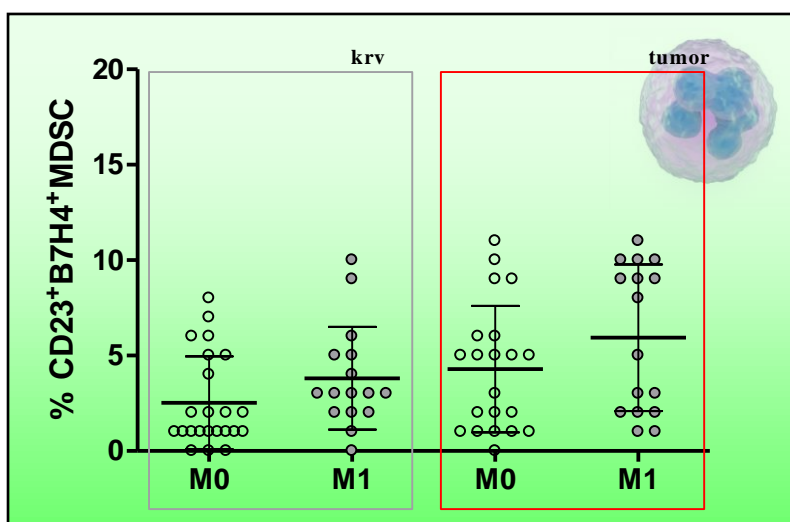
## Вредности $CD23^+B7H4^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC су детектоване код пацијената са метастазама (M1) у односу на пацијенате без метастаза (Табела 51, График 20). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође су веће вредности ових ћелија детектоване код пацијената са метастазама у односу на оне без метастаза.

Табела 51. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв		Микроциркулација тумора	
	M0	M1	M0	M1
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	8,00	10,00	11,00	11,00
<i>Med</i>	1,00	3,00	5,00	6,50
<i>SE</i>	0,51	0,67	0,72	0,96
<i>X</i>	2,52	3,81	4,29	5,94
<i>SD</i>	2,43	2,69	3,32	3,84

График 20. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Поређењем вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $M$  стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између вредности у  $M1$  и у  $M0$  стадијуму (*Mann Whitney test*) (Табела 52). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика између вредности ових ћелија у групи пацијената без метастаза и са њима.

Табела 52. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC између група болесника са и без метастаза у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
$M0 / M1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Анализом вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим  $M$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената без метастаза, док таква разлика није показана код пацијената са метастазама (Табела 53).

Табела 53. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према нодалном статусу постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$M0$	<i>ns</i>	$p = 0,0014$
$M1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>



#### 4.6. Клинички стадијум и MDSC

##### Вредности $CD14^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су анализиране у односу на клинички стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената у III стадијуму у односу на IV стадијум болести (Табела 54, График 21). У узорцима крви из микроциркулације тумора вредности су такође биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

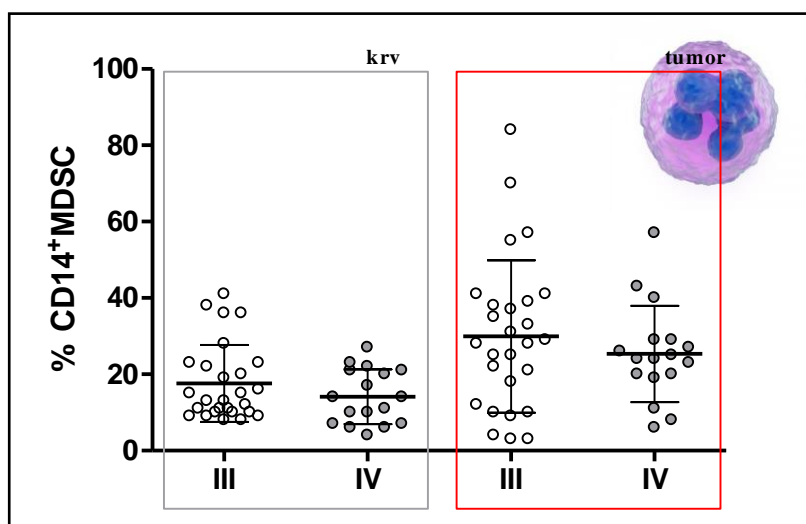
Поређењем вредности  $CD14^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, није нађена статистички значајна разлика вредности између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 55). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика вредности ових ћелија између група пацијената у III и IV стадијуму болести.

Анализом вредности  $CD14^+$  MDSC код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 56).

Табела 54. Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD14^+$ MDSC	Крв		Микроциркулација тумора	
Клинички стадијум	III	IV	III	IV
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	8,00	4,00	3,00	6,00
<i>Max</i>	41,00	27,00	84,00	57,00
<i>Med</i>	13,00	14,00	28,00	24,00
<i>SE</i>	1,94	1,74	3,85	3,06
<i>X</i>	17,63	14,12	29,93	25,35
<i>SD</i>	10,07	7,18	19,99	12,61

График 21. Просечне вредности  $CD14^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Табела 55. Упоредна анализа вредности  $CD14^+$  MDSC између група болесника различитог клиничког стадијума у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора плућа

$CD14^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 56. Упоредна анализа вредности  $CD14^+ MDSC$  према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p = 0,0177$	$p = 0,0142$
IV	$p = 0,0036$	$p = 0,0129$

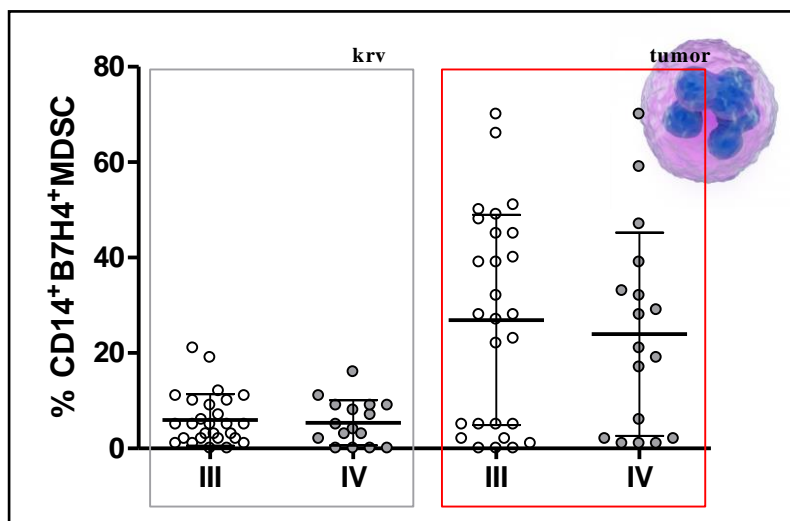
**Вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму**

Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су анализиране у односу на клинички стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената у III стадијуму у односу на IV стадијум болести (Табела 57, График 22). У узорцима крви из микроциркулације тумора вредности су такође биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Табела 57. Просечне вредности  $CD14+B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD14^+B7H4^+MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
<i>N</i>	26	17	27	17
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	21,00	16,00	70,00	70,00
<i>Med</i>	5,00	4,50	28,00	21,00
<i>SE</i>	1,04	1,18	4,24	5,16
<i>X</i>	5,96	5,38	26,93	23,94
<i>SD</i>	5,42	4,72	22,03	21,28

График 22. Просечне вредности  $CD14+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Поређењем вредности  $CD14+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, није нађена статистички значајна разлика вредности између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 58). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика вредности ових ћелија између група пацијената у III и IV стадијуму болести.

Анализом вредности  $CD14+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 59).

Табела 58. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог клиничког стадијума у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 59. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p = 0,0027$	$p < 0,0001$
IV	$p = 0,0122$	$p = 0,0007$

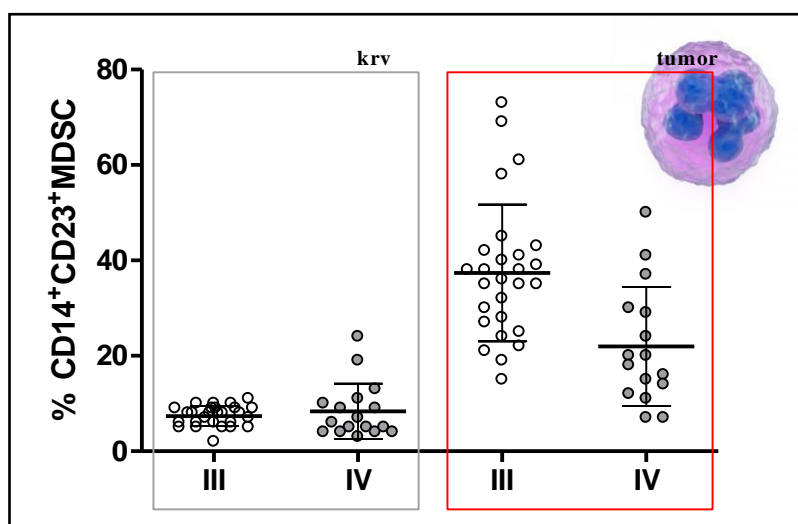
#### Вредности $CD14^+CD23^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су анализиране у односу на клинички стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности ових ћелија су детектоване код пацијената у IV стадијуму у односу на пацијенте у III стадијуму болести (Табела 60, График 23), док су у узорцима крви из микроциркулације тумора вредности биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Табела 60. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	2,00	3,00	15,00	7,00
<i>Max</i>	11,00	24,00	73,00	50,00
<i>Med</i>	8,00	6,00	36,00	19,00
<i>SE</i>	0,40	1,40	2,76	3,12
<i>X</i>	7,37	8,35	37,37	21,94
<i>SD</i>	2,10	5,79	14,36	12,47

График 23. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Поређењем вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, није нађена статистички значајна разлика вредности између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 61). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност ових ћелија код пацијената у III стадијуму болести у односу на пацијенте у IV стадијуму.

Анализом вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 62).

Табела 61. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника различитог клиничког стадијума у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	ns	$p = 0,0009$

Табела 62. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	Mann Whitney test	Wilcoxon test
III	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
IV	$p = 0,0001$	$p = 0,0005$

**Вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму**

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC су детектоване код пацијената у IV стадијуму болести у односу на пацијенте у III стадијуму (Табела 63, График 24), док су у узорцима крви из микроциркулације тумора вредности биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Поређењем вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, није нађена статистички значајна разлика вредности између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 64), а слично је и у узорцима крви из микроциркулације тумора.

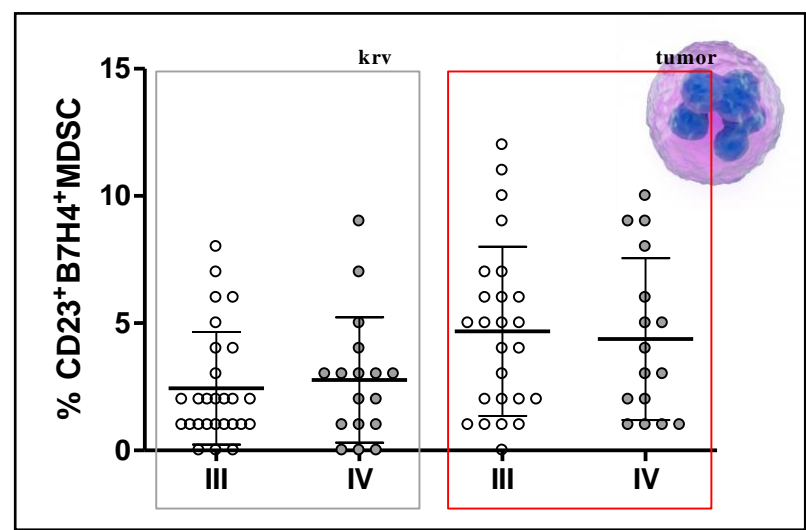
Анализом вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 65).

Табела 63. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	8,00	9,00	12,00	10,00
<i>Med</i>	2,00	3,00	5,00	3,50
<i>SE</i>	0,42	0,60	0,67	0,80
<i>X</i>	2,44	2,77	4,68	4,38
<i>SD</i>	2,21	2,46	3,33	3,18



График 24. Просечне вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC (%) у узорцима системске циркулације и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Табела 64. Упоредна анализа вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC између група болесника различитог клиничког стадијума у системској циркулацији и у микроциркулацији тумора

$CD23^{+}B7H4^{+}$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 65. Упоредна анализа вредности  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p = 0,0104$	$p = 0,0004$
IV	<i>ns</i>	$p = 0,0438$

## 5. ДИСКУСИЈА

У овој студији показано је постојање значајно веће учесталости  $CD14^+$  MDSC,  $CD14^+B7H4^+$  MDSC,  $CD14^+CD23^+$  MDSC и  $CD23^+B7H4^+$  MDSC код оболелих са карциномом плућа у поређењу са здравим контролним пацијентима.

Чен (Y. Chen) и сарадници су показали да је инциденца  $CD14^+$  и  $HLA-DR^{-/low}$  ћелија у периферној крви пацијената са плућним сквамозелуларним карциномом значајно повећана у односу на здраву контролну групу, те да вредности MDSC директно корелирају са TNM стадијумом (159). Повећан број MDSC такође је повезан са значајним смањењем броја  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т лимфоцита у узорцима крви пацијената, као и поремећајем секреције цитокина у културама Т лимфоцита, што указује на имуносупресивни утицај ових MDSC (159, 160, 161).

Резултати наших испитивања показали су да се вредности испитиваних популација MDSC повећавају код болесника са порастом величине тумора ( $T$  стадијума). Повећање је било присутно како у узорцима крви, тако и у узорцима микроциркулације тумора плућа. Са порастом  $T$  стадијума расла је и учесталост  $CD14^+$  MDSC,  $CD14^+B7H4^+$  MDSC,  $CD14^+CD23^+$  MDSC и  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорак из крви истих пацијената.

Хуанг и сарадници су показали да су циркулишући  $CD14^+$   $HLA-DR^{-/low}$  MDSC модулатори антитуморског одговора и да су повезани са метастазирањем тумора и изостанком одговора на терапију код пацијената са NSCLC (162). Они су анализирали 89 пацијената са узнатредовалим NSCLC. Вредности  $HLA-DR^{-/low}$   $CD14^+$  MDSC (исказане као проценат укупних  $CD14^+$  ћелија) биле су значајно веће код пацијената са NSCLC у односу на здраве контролне пацијенте. Вредности су такође биле пропорционалне клиничком стадијуму болести. Моноцитни MDSC такође су значајно негативно корелирали са медијаном преживљавања и временом без прогресије болести. Функција  $CD14^+$   $HLA-DR^{-/low}$  ћелија у инхибицији Т ћелијске функције пацијената са NSCLC повезана је са усходном регулацијом експресије gp91phox, важном компонентом ROS генеришућег ензима NADPH оксидазе. Тјан (T. Tian) и сарадници утврдили су да је код пацијената са ситноћелијским карциномом плућа учесталост  $CD14^+HLA-DR^{-/low}$  MDSC у негативној корелацији са клиничким исходом (119).

Фенг и сарадници описују карактеристике  $CD11b^+CD14^+S100A9^+M-MDSC$  у периферној крви и њихов клинички значај за пацијенте са узнатредовалим NSCLC.

Високе вредности  $CD11b^+CD14^+S100A9^+M$ -MDSC удружене су са слабом терапијским одговором на цисплатину и скраћеним интервалом до прогресије болести (PFS) (114).

У студији Жанга (Zhang) и сарадника идентификована је нова субпопулација MDSC у туморској микрооколини код пацијената са NSCLC,  $B7H3^+CD14^+HLA-DR^{-low}$  MDSC ( $B7H3^+$  MDSC). Њихови резултати сугеришу да повећан број те нове MDSC субпопулације корелира са лошијим TNM стадијумом и метастазирањем и може бити предиктор скраћеног времена до појаве релапса болести код пацијената са NSCLC. Друге студије указују на то да  $B7H3^+$  MDSC узрокују прогресију карцинома кроз лучење IL-10, који индукује регрутацију и /или активност Treg ћелија у туморској микрооколини (120).

Експресија имуносупресивног молекула B7-H4 је раније идентификована у узорцима туморског ткива пацијенткиња са гинеколошким малигнитетима јајника и материце, као и код пацијената са колоректалним карциномом и карциномом панкреаса (134, 163). Показано је да је у физиолошком стању B7-H4 одсутан са површине нормалних ћелија (146). Поред малигних ћелија, B7-H4 се екстензивно ствара и на површини макрофага који инфилтришу тумор, а до две трећине туморских асцитних  $CD14^+$  макрофага такође јесу B7-H4<sup>+</sup> (165, 166).

Крејчекова (I. Kreuzcek) и сарадници показали су значај B7-H4<sup>+</sup> макрофага у хуманим оваријалним карциномима (167,168). Испитивали су  $CD14^+$  моноците, B7-H4<sup>-</sup> и B7-H4<sup>+</sup> макрофаге као и регулаторне Т лимфоците у узорцима нативног туморског ткива, асцитеса и крви 103 пацијенткиње са оваријалним карциномом. Иако туморске ћелије експримирају B7-H4 и интрацелуларно, само тумор инфилтришући макрофаги показују и мембранску експресију B7-H4. Експресија B7-H4<sup>+</sup> је индуцибилна јер је могуће трансформисати моноците из периферне крви туморским асцитесом или дејством IL-6 и IL-10. Интересантно је да IL-4 и GM-CSF негативно регулишу *ex vivo* и *in vitro* B7-H4<sup>+</sup> експресију на макрофагима. Аутори су иницијално закључили да промена профила локалне секреције, високих вредности IL-6 и IL-10, као и ниских вредности IL-4 и GM-CSF резултира трансформацијом тумор асоцираних макрофага према B7-H4<sup>+</sup> ћелијама. Још значајније, Крејчекова и сарадници даље демонстрирају да B7-H4<sup>+</sup> макрофаги супримирају *in vitro* активност Т лимфоцита специфичних за HER2/Neu антиген на начин који је независан од B7-H1 механизма, аргиназе или активности iNOS. Будући да се детектује велики број B7-H4<sup>+</sup> макрофага у туморском асцитесу, који у великој мери превазилази број

регулаторних Т лимфоцита (30% vs. 5%), аутори су закључили да ове ћелије представљају главну имуносупресивну силу која резултира промоцијом туморског раста.

Мацунага (Т. Matsunaga) и сарадници испитивали су везу између  $CD14^+B7-H1^+$  или  $CD14^+B7-H4^+$  ћелија у крви или у тумору са клиничким и туморским карактеристикама код пацијената са карциномом желуца (169). Најпре су показали да ниво  $B7-H1^+$  или  $B7-H4^+$  експресије значајно расте на моноцитима пацијената са карциномом желуца у односу на здраве контроле. Даље су утврдили да моноцити изоловани из тумора експримирају значајно више  $B7-H1^+$  или  $B7-H4^+$ , у поређењу са моноцитима из крви истих пацијената. Насупрот овим подацима, у нашој студији експресија  $B7-H4^+$  директно следи ниво  $HLA-DR$  експресије на  $CD14^+$  ћелијама. Разлике настају услед различитих стратегија селекције популација ћелија, будући да је наш циљ био да испитамо  $MDSC$  које су  $HLA-DR^{low}$  по дефиницији. Такође, треба имати у виду да су наведени аутори показали значајан имуносупресиван капацитет  $CD14^+B7-H4^+$  ћелија *in vitro* (редукцијом секреције  $IFN-\gamma$  од стране  $T$   $Ly$ ), као и то да хируршка ресекција тумора резултира смањењем испољавања  $B7-H4^+$  на циркулишућим  $CD14^+$  ћелијама. Аутори су демонстрирали и значајне разлике у различитим узорцима (крв/тумор) по броју  $CD14^+B7-H1^+$  или  $CD14^+B7-H4^+$  у односу на хистолошки тип карцинома желуца, дубину инвазије, величину тумора, број позитивних лимфних чворова, клинички стадијум и ниво лимфоваскуларне инвазије. Њихови резултати су у сагласности са подацима из наше студије и указују на то да је величина тумора и степен раширености болести директно повезан са бројем супресивних  $CD14^+B7-H4^+$ . Значајно је истаћи да су и њихови пацијенти у раним клиничким фазама болести такође демонстрирали безначајно више вредности броја  $CD14^+B7-H4^+$  у поређењу са каснијим стадијумима болести.

Подаци о улози  $MDSC$  код пацијената са карциномом плућа су још увек недовољни, посебно они који се односе на  $B7-H4^+$   $MDSC$ .

Тан (Z. Tan) и Шен (W. Shen) су радили студију о прогностичком значају вредности  $B7-H4$  код пацијената са  $NSCLC$  као мета-анализу и уочили значајну повезаност прекомерне експресије  $B7-H4$  са величином тумора, бројем позитивних лимфних чворова и присуством метастаза, али без значајног утицаја на туморску хистологију и друге, епидемиолошке факторе (170). У закључку ове студије наводи се да је експресија  $B7-H4$  негативни прогностички фактор за  $NSCLC$  пацијенте. Нажалост, њихова студија садржи и једну велику непрецизност, јер су у критеријуме

за избор (критеријум бр. 2) укључили пацијенте са експресијом *B7-H4* откривене било којом методом, што имплицира да не разликују експресију на малигном ткиву или леукоцитном инфилтрату.

Чен и сарадници су испитивали учесталост *CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> MDSC* у узорцима крви 80 пацијената са сквамозним типом карцинома плућа (*NSCLC*) (159) у односу на здраве контролне особе. Резултати студије показали су да се број *MDSC* постепено повећава код ових пацијената, те да он директно корелира са повећањем вредности *TNM* стадијума. Аутори су закључили да је значајно смањење броја *CD4<sup>+</sup> T* и *CD8<sup>+</sup> T* у узорцима крви ових болесника, као и измењена продукција цитокина *T* лимфоцита *in vitro*, последица утицаја *MDSC*.

Експресија имуносупресивних молекула из ове породице показана је и на антиген презентујућим ћелијама. Дендритичне ћелије (*DC*) изоловане из ресектата тумора *NSCLC* пацијената експримирају друге имуносупресивне молекуле, такође из *B7* фамилије, као што је *B7-H3* (171). Ове дендритичне ћелије показују значајно ослабљену костимулаторну активност према аутологим *T* лимфоцитима, производе значајно више *IL-10* и мање *IL-12* него контроле.

*Ex vivo* студије показале су да циркулишуће туморске ћелијске линије пацијената са *SCLC* индукују трансформацију моноцита периферне крви у правцу диференцијације у *CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup>CD68<sup>+</sup>B7-H4<sup>+</sup>* тумор асоциране макрофаге (172).

Аутор Фенг и сарадници указују на значај *MDSC* код пацијената са плућним аденокарциномом (*Ad NSCLC*), позитивним на *EGFR* мутације (173). Такође, указују и на то да је број *SI00A9<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> MDSC* био повећан у крви оболелих у поређењу са здравим контролним пацијентима. Оболели са лошим одговором на терапију, као и они са кратким интервалом до прогресије болести, имали су повећан број *MDSC* у поређењу са другима. Такође, као и у нашој студији, број *MDSC* је био много виши у туморским узорцима у поређењу са одговарајућим узорцима крви.

Субпопулације *MDSC* у крви *NSCLC* пацијената биле су повећане у поређењу са здравим контролним пацијентима, али такође су показале повећање броја у подгрупи оболелих са *COPD*, хроничном опструктивном болешћу плућа (енг. *chronic obstructive pulmonary disease*) као секундарним контролама (174). Иста студија је показала да су *MDSC* биле много фреквентније у ткиву ресектованог тумора него у узорцима крви пацијената са *NSCLC*. Подаци из ове студије такође указују на разлике између карцинома плућа различитих хистолошких типова. Пацијенти са сквамозним типом карцинома плућа показивали су повећан број гранулоцитима

налик *MDSC* у поређењу са пацијентима са аденокарциномом плућа, али без разлика у моноцитима налик *MDSC*. Ово је у сагласности са нашим резултатима, будући да смо показали да нема значајне разлике у фреквенцији *CD14<sup>+</sup> MDSC* између група *NSCLC* пацијената, изузев за пацијенте са ситноћелијским карциномом плућа у односу на остале хистолошке типове. Насупрот томе, Јамаучи (Y. Yamauchi) и сарадници су показали да група пацијената са аденокарцином плућа има значајно већи број *CD14<sup>+</sup>B7-H1<sup>+</sup> MDSC* и *CD15<sup>+</sup>B7-H1<sup>+</sup> MDSC* у поређењу са пацијентима са сквамозним карциномом (175).

У предходној студији утврдили смо да се одређени хистолошки типови карцинома плућа карактеришу јединственим профилем цитокина како у узорцима крви, тако и у узорцима туморске микроциркулације (176). Сви наши пацијенти са тумором плућа имали су смањене серумске концентрације *TGF- $\beta$ 1* у поређењу са здравим контролним узорцима. Највеће концентрације *TGF- $\beta$ 1* у туморској микроциркулацији су детектоване код пацијената са сквамозним тумором, који је био значајно повишен у поређењу са осталим групама. Вредности серумског *TGF- $\beta$ 1* корелирале су са величином тумора, а биле су највише код пацијената у Т4 групи, што су и други аутори документовали (177, 178). Изненађујуће, пацијенти у поодмаклим стадијумима болести, IV клиничком стадијуму или са присутним метастазама (*M1*), имали су ниже вредности *TGF- $\beta$ 1* (у поређењу са стадијумом III или *M0*) и у серуму и у туморској микроциркулацији. Претпоставља се да су интеракције имуносупресивних ћелија и ослобађање медијатора много важније у раним стадијумима болести када је неопходно креирање есенцијалних услова за ширење болести.

Анализа цитокина у серуму и у туморској микрооколини узорака болесника са карциномом плућа показала је да у туморској микроциркулацији постоји значајно повећање вредности *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1* у односу на серумске вредности истих болесника, као и да постоји значајна корелација између вредности *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1* у туморима ових болесника.

Јарнички (G. Jarnicki) и сарадници (179) указују на инфилтрацију тумора *CD4<sup>+</sup> T* регулаторним ћелијама. Они су показали да значајна продукција *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1* изазвана карциномским ћелијама индукује инфилтрацију растућег тумора *CD4<sup>+</sup>* и *CD8<sup>+</sup> Treg* ћелијама. Такође, деплеција *CD8<sup>+</sup> T* регулаторних ћелија редукује туморску масу, смањујући њихову способност да инхибирају антитуморски одговор.

Наведени цитокини, *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1*, такође су важни у активацији, потенцирању имуносупресорских дејстава и пропагацији *MDSC*.

Подаци из бројних експерименталних и клиничких студија сведоче о томе да је цитокинска мрежа важан фактор који обликује противтуморски одговор. Иако је имунски одговор на тумор веома комплексан и динамичан, а зависи од индивидуалних туморских карактеристика, стадијума болести, као и карактеристика имунског одговора, преобладајући став је да је *Th1* одговор везан за протективни противтуморски одговор, док *Th2* карактерише про-туморску микрооколину. Такође, аутори бројних студија тврде да постоји доминација *Th2* над *Th1* профилем у узорцима пацијената са карциномом плућа, те да је овакав дисбаланс повезан са имуносупресивним својствима тумора и напредовањем болести.

У биопсијама тумора плућа и плеуралним ефузијама пацијената са *NSCLC* показано је присуство високих концентрација *IL-6*, *IL-10*, *GM-CSF* и *IFN- $\gamma$*  као и ниског нивоа информационе *RNK* за *IL-2* (180), доминација *IL-4* / *IL-10* над *IL-2* / *IL-12* / *IFN- $\gamma$*  (181, 182, 183). Такође је показано постојање доминације *Th2* популације у периферној крви (184) и депресија цитотоксичности паралелно са смањеном *IFN- $\gamma$*  продукцијом у *NK* / *NKT* ћелијама (185). Показано је да код пацијената са *NSCLC* успешна терапија редукује вредности *Th2* и повећава вредности *Th1* (25,26).

Прве назнаке о биолошком значају доминације *Th2* профила у физиологији карцинома плућа дали су Жанг (B. Zhang) и сарадници (186). У узорцима туморског ткива *NSCLC* пацијената, али не и у узорцима бенигних лезија, они су показали интензивну инфилтрацију макрофагама, при чему је 75% макрофага одговарало *M2* типу, тзв. алтернативно активираним, неklasичним макрофагама, које су функционално најближе *MDSC*. Даље, присуство великог броја оваквих макрофага било је значајно удружено са високим концентрацијама *IL-4* / *IL-10* и ниским *IFN- $\gamma$*  / *IL-12*, односно доминацијом *Th2* / *Th1*.

Две студије Итоа (N. Ito) и сарадника демонстрирале су комплексност и динамичност промена *Th1/Th2* профила у односу на различиту микрооколину тумора и прогресију болести (187, 188). Пре двадесет година, они су показали да су тумор инфилтришући лимфоцити пацијената са *NSCLC* доминантно *Th1* типа, док Т лимфоцити у периферној крви истих пацијената одговарају *Th2* популацији (187). Они су проширили своје истраживање и на цитотоксичну популацију Т лимфоцита (*Tc*) и након пет година праћења показали су преминацију *Th2/Th1* удружену са

*Tc2/Tc1* (188). Изненађујуће, ови високи *Th2/Th1* и *Tc2/Tc1* односи, пронађени у периферној крви, били су значајно удружени са бољом прогнозом код *NSCLC* пацијената са одмаклом болешћу (клинички стадијум II и III), али не и код једанаест пацијената у раном стадијуму болести (стадијум I). Ове студије су показале да постоји значајна разлика профила цитокинског одговора између различитих тумора плућа у периферној крви, као и да постоји важна промена која следи или рефлектује прогресију болести.

Фенг и сарадници су показали значајну улогу *CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>S100A9<sup>+</sup>* супресивних моноцита, изолованих из узорака периферне крви пацијената са *NSCLC* (114). Пацијенти са унапредовалим обликом болести и неуспешним терапијским одговором имали су значајно више ових ћелија у односу на здраве контролне особе. Ова популација моноцита испољавала је супресивне активности *in vitro*, потентно инхибирајући *CD8<sup>+</sup>* Т ћелијску активацију, инхибирајући продукцију *IFN-γ* и секретујући велике количине *iNOS*, аргиназе, *IL-8*, *IL-10*, *TNF-γ*, *HGF* и *IL-13*. Аутори су закључили да *CD14<sup>+</sup>S100A9<sup>+</sup>* инфламаторни моноцити код пацијената са *NSCLC* представљају посебну субпопулацију *MDSC*, способну да супримира Т лимфоците продукцијом *iNOS*, и *IL-13/IL-4Rα*. *TAM* и *MDSC*, или супресивни Мо нису једини извор *IL-13* у туморима плућа, будући да је историјска студија Хуанга и сарадника. показала да су ћелије карцинома плућа потентни извор *IL-13* (189). Значај *IL-13* у регулацији туморске инвазије и ширења је већ описан код оваријалних карцинома (190) и карцинома панкреаса (191).

Насупрот другим студијама у којима су били разматрани искључиво *NSCLC* пацијенти, у нашој студији су обухваћене обе групе пацијената, и са *NSCLC* и са *SCLC*. Анализа свих пацијената, без стратификације по било ком параметру, показала је да нема значајних разлика у концентрацијама испитиваних цитокина. Наши подаци сведоче пак о значајној разлици у односу *Th1/Th2* цитокина између локалног и системског имунског одговора (тумор/периферна крв). Такође, показали смо да су пацијенти са ситноћелијским хистолошким типом тумора, без метастаза и са најмањим тумором, имали највишу локалну продукцију *IL-12 / IL-2*, *IFN-γ* (192). Стратификација према хистолошким групама тумора, обиму болести и величини тумора, открила је значајне разлике. Код пацијената са различитим хистолошким типовима карцинома плућа утврдили смо битне разлике како у серумским узорцима, тако и у узорцима микроциркулације тумора. Присуство метастаза било је повезано



са повећањем *IFN- $\gamma$*  / *IL-4* у крви и повећањем концентрације *IL-13* у узорцима микроциркулације тумора. Узорци микроциркулације код највећих тумора значајно су повезани са повећањем концентрације *Th2* цитокина у односу на мање туморе. Вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> Мо* у узорцима крви битно су биле повезане са повећањем концентрације *IL-2* / *IL-13*. Пацијенти са највећим бројем *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> Мо* у узорцима микроциркулације тумора показали су значајан пораст *IL-4*, *IL-13*, *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1*. Највеће вредности броја *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>* моноцита биле су повезане са *Th2* цитокинским профилем. Закључак ове студије био је да пацијенти са карциномом плућа показују поларизацију цитокинског одговора, повезану са врстом микрооколине, хистолошким типом тумора, величином тумора и проширеношћу болести.

У студији Карличиха и сарадника показали смо да је концентрација *IL-27* осетно повећана у туморској микрооколини испитиваних пацијената са туморима плућа у поређењу са серумским узорцима (193). Иако су вредности мање у односу на здраве контролне особе, пацијенти у раним клиничким стадијумима, са мањим туморима и без метастаза, имају битно мање *IL-27* у оба случаја у односу на пацијенте са великим туморима и раширеном болешћу. Хистолошки тип тумора је значајан не само због различитих биолошких карактеристика, већ и због значајних разлика у продукцији *IL-27*. Удруженост високих концентрација *IL-27* са малим туморима, ранијим клиничким стадијумом и одсуством метастаза указује да *IL-27* има противтуморску функцију код пацијената са карциномом плућа.

У студији са лимитираним бројем *NSCLC* пацијената, Погода (К. Pogoda) и сарадници су показали да *CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> MDSC* нису једина популација која учествује у туморски изазваној имуносупресији (194). Поред *MDSC* популације *CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>* моноцитна популација је значајан извор *IL-10* у узорцима лимфних нодуса, и *IL-1 $\beta$*  и *TNF- $\alpha$*  у периферној крви, лимфним чворовима и туморском ткиву.

Хјувер (М. Heuvers) и сарадници су испитивали фреквенцу *MDSC* у узорцима крви 185 *NSCLC* пацијената и показали повећање њиховог броја, специјално популације налик гранулоцитима код пацијената са карциномом плућа у односу на здраве контролне особе (116). Они су такође показали да је супресивни капацитет *MDSC* значајно удружен са активношћу аргиназе -1.

Већина објављених радова рефлектује истраживања у популацији *NSCLC* пацијената. У студији која је обухватала 42 *SCLC* пацијента, Тјан (Т. Tian) и

сарадници су показали да су апсолутни број и учесталост крвних  $CD14^{+}HLA-DR^{-low}$  *MDSC* значајно повећани код ових пацијената у односу на контролне пацијенте и да учесталост *MDSC* корелира са туморским стадијумом, нивоом серумског *LDH* и краћим укупним преживљавањем (119). *SCLC* пацијенти из наше студије показали су највеће средње вредности броја  $CD14^{+}HLA-DR^{-low}$  *MDSC*, али у узорцима из туморске микроциркулације.

*B7-H4* има изражен инхибиторни ефекат на развој и функцију Т ћелија (195). Студије такође сугеришу да је *B7-H4* прогностички показатељ краћег преживљавања и различитих клиничких патолошких особина код различитих врста карцинома (128, 196, 197).

*B7H4 iRNK* је широко присутна у периферним ткивима човека, укључујући плућа, тестисе, панкреас, простату, плаценту, матерницу, кожу, мишиће, желуца, бубреге, јетру, срце, мозак и јајнике (198, 195, 127). Присуство *B7H4* такође је уочено код колоректалног карцинома, карцинома простате и плућа и фибросаркома (128, 129). Многобројне студије су показале присуство *B7H4 iRNK* у 23 ћелијске линије меланома (129), 5 линија карцинома желуца (130) и 6 линија *NSCLC* (131). Такође, солубилни *B7H4* је идентификован у узорцима крви пацијената са карциномом јајника, дебелог црева, бубрега, дојке, плућа и карцинома простате (131, 132, 133, 134, 135, 136). Ова испитивања показују да серумски *B7H4* може бити користан маркер за дијагнозу и прогнозу болести.

Присуство *B7H4* у хуманим туморима је највероватније последица неадекватне пост-транскрипционе регулације у туморима, пошто је присуство нормалних протеина ретко на ћелијској површини у нормалним људским ткивима (199). Будући да је *B7H4* значајно експримиран у бројним хуманим карциномима, може се претпоставити да је експресија *B7H4* механизам редукције антитуморске имуности, нарочито Т-ћелијског одговора (128). *B7H4* инхибира функцију Т ћелија (198, 195, 127, 128), па према томе, блокирање раста тумора повезаног са *B7H4* може пружити нову терапијску опцију за побољшање антитуморског имунитета.

Ванг (L. Wang) и сарадници су у студији из 2016. године предложили различите механизме којима се објашњавају инхибиторна улога *B7H4* у имунологији карцинома: инхибиција пролиферације Т ћелија, индукција апоптозе Т ћелија, заустављање Т ћелија у ћелијском циклусу, сузбијање секреције цитокина и цитотоксичност Т ћелија, промоција пролиферације и развоја *Treg* и инхибиције функције антиген презентујућих ћелија (200).

У метаанализи (170), која је обухватала 1444 пацијента код којих је експресија *B7H4* одређена разним методама, показано је да је повишена експресија *B7H4* значајно повезана са присуством метастаза у лимфним чворовима, вишим *TNM* стадијумом болести, лошом диференцијацијом и краћим преживљавањем код пацијената са *NSCLC*. Аутори су закључили да је висока *B7H4* експресија неповољан прогностички фактор код *NSCLC*.

Пре више од десет година показан је значај *B7H4*<sup>+</sup> макрофага у карциному јajника код људи (167, 168). Аутори су испитивали *CD14*<sup>+</sup> моноците, *B7H4*<sup>-</sup> и *B7H4*<sup>+</sup> макрофаге, као и регулаторне Т лимфоците изоловане из свежих узорка тумора, асцитеса изазваног тумором и узорака крви пацијента са карциномом јajника. Иако су туморске ћелије такође експримирале унутарћелијску *B7H4*, само тумор инфилтришући макрофаги су показали површинску *B7H4*<sup>+</sup> експресију. Аутори су у почетку закључили да промена концентрације локалних фактора, са високом *IL-6* и *IL-10* и ниским *IL-4* и *GM-CSF*, доводи до трансформације макрофага у туморима према *B7H4*<sup>+</sup> ћелијама. Узимајући у обзир велики број *B7H4*<sup>+</sup> макрофага повезаних са тумором откривених у асцитесу, који је у великој мери премашао регулаторне Т лимфоците (30% насупрот 5%), аутори су закључили да ове ћелије могу бити главна имуносупресивна сила, што резултира експанзијом тумора.

Група аутора је показала да се ниво експресије *B7H1*<sup>+</sup> или *B7H4*<sup>+</sup> значајно повећава на моноцитима пацијената са карциномом желуца, у поређењу са здравим контролним пацијентима (169). Открили су и да моноцити изоловани из тумора изражавају значајно више *B7H1*<sup>+</sup> или *B7H4*<sup>+</sup> у поређењу са моноцитима из крви истог пацијента и да је експресија ових супресивних молекула директно повезана. Ови аутори су показали значајан имуносупресивни капацитет *CD14*<sup>+</sup>*B7H4*<sup>+</sup> ћелија *in vitro* (смањење секреције *IFN-g* Т лимфоцита), а такође су открили да је хируршко уклањање тумора резултирало смањењем *B7H4*<sup>+</sup> у циркулишућим *CD14*<sup>+</sup> ћелијама. Они су такође показали разлике између крви и тумора у *CD14*<sup>+</sup>*B7H1*<sup>+</sup> или *CD14*<sup>+</sup>*B7H4*<sup>+</sup> ћелијама према хистопатолошком типу карцинома желуца, дубини инвазије, величини тумора, захваћености лимфних чвора, клиничком стадијуму болести и нивоу лимфоваскуларне инвазије. Њихови подаци подударају се са подацима наше студије, који указују на то да су величина тумора и степен ширења болести директно повезани са бројем супресивног броја *CD14*<sup>+</sup>*B7H4*<sup>+</sup>.

Аутори су нагласили и значај *MDSC* код пацијената са аденокарциномом плућа који су били позитивни на мутацију *EGFR* (173). Такође су показали да је у

узорцима крви оболелих повећан број *MDSC* у поређењу са здравим контролним пацијентима. Пацијенти са лошим одговором на терапију, као и пацијенти са кратким периодом без прогресије болести, имали су повећан број *MDSC* у поређењу са другима. Као и у нашој студији, број *MDSC* је био много већи у узорцима тумора у поређењу са узорцима крви. Недавна студија *MDSC* субпопулација из крви код *NSCLC* пацијената показала је да је њихов број повећан у поређењу са здравим контролним пацијентима (174). Иста студија показала је да су *MDSC* чешће у ресецираном туморском ткиву него у узорцима крви *NSCLC* пацијената. Подаци ове студије показали су разлике између оболелих са карциномом плућа са различитим патохистолошким типом тумора. Пацијенти са сквамозелуларним карциномом плућа показали су повећан број гранулоцитима сличних *MDSC* у поређењу са групом аденокарцинома, али без разлике у моноцитима сличних *MDSC*. То је у складу са нашим подацима, јер нисмо показали значајне разлике у фреквенцији *CD14<sup>+</sup> MDSC* између пацијената са *NSCLC*, већ само између ситноћелијског карцинома у односу на остале. Поред тога, показано је да група аденокарцинома плућа има значајно више *CD14<sup>+</sup>B7H1<sup>+</sup> MDSC* и *CD15<sup>+</sup>B7H1<sup>+</sup> MDSC* у поређењу са сквамозелуларним карциномом плућа. У нашем ранијем истраживању показали смо да је различит хистолошки тип карцинома плућа значајно повезан са одређеним профилем цитокина, како у узорцима крви, тако и у узорцима микроциркулације тумора (176).

Имуносупресивне ћелије, попут *MDSC*, тумор повезаних макрофага (*TAM*) и регулаторних Т (*Treg*) ћелија, делују као супресивне компоненте за ублажавање имунолошких одговора (201). Међу овим ћелијама, *MDSC* имају улогу у прогнози, развоју и лечењу карцинома плућа (202, 203). *MDSC* су укључени не само у контролу антитуморских имунских одговора, већ и у прогресију тумора кроз стимулацију ангиогенезе тумора, инвазије туморских ћелија и формирање преметастатске нише (204, 205). Нивои *MDSC* су уско повезани са исходом болести и терапијским ефектима код пацијената са карциномом плућа (206). Такође, карциноми плућа са високим нивоом *MDSC* су резистентни на хемиотерапију, циљану терапију и имунотерапију, те имају генерално лошу прогнозу (207, 208).

Мали је број радова о клиничком значају *MDSC* код пацијената са карциномом плућа. У ревијалном раду из 2020. године о значају *MDSC* (121), приказани су резултати код пацијената са карциномом плућа. У једној студији је показано да *CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup> MDSC* из периферне крви 60 пацијената са *NSCLC* негативно корелирају са преживљавањем пацијената без прогресије болести (113). У

другој студији је показано да су  $CD14^+HLA-DR^{-/low}$  MDSC из периферне крви, код 42 пацијента са ситноћелијским карциномом плућа, независни биомаркер лошије прогнозе болести (119). У узорцима периферне крви  $CD11b^+CD14^+S100A9^+$  MDSC код 24 пацијената са узнатредовалим NSCLC, показано је да овај фенотип MDSC корелира са лошијим одговором на хемиотерапију и краћим временом до прогресије болести (114). У другој студији на 111 пацијената са NSCLC показано је да  $B7-H3^+CD14^+HLA-DR^{-/low}$  из узорка периферне крви скраћују преживљавање без појаве рецидива болести (120). У студији на 24 NSCLC пацијената у узорцима периферне крви показано је да се удео  $lin^-CD14^+CD11b^+CD39^+CD73^+$  M-MDSC значајно смањује са хемиотерапијским циклусима у групи пацијената са стабилном болешћу и парцијалним одговором на терапију, док се број повећава у групи са прогресивном болешћу (151). У студији Ветсика (Е. Vetsika) и сарадника показано је да су  $Lin^-CD14^+CD15^+CD11b^+CD33^+HLA-DR^-$  MDSC код 110 пацијената са NSCLC независан прогностички маркер скраћења укупног преживљавања и преживљавања без прогресије болести (115). Код 61 пацијента са метастатским обликом NSCLC показано је да  $Lin^-CD33^+CD14^+CD15^-HLA-DR^-$  пацијенти имају смањено укупно преживљавање ако су на анти-PD-1 третману (209). Код 7 пацијената са NSCLC показано је да се подтип  $CD33^+CD11b^+CD14^+HLA-DR^{-/low}$  M-MDSC смањује након радиотерапије (*stereotactic body radiotherapy*) (210). Код 42 пацијента са ресектабилним NSCLC показано је у узорцима периферне крви и у узорцима туморског ткива да постоји значајна корелација нижег броја  $CCR5^+HLA-DR^{-/low}CD11b^+CD14^+CD15^-$  M-MDSC и периода без појаве релапса болести (175).

У нашој студији смо показали значајну повезаност броја  $CD14^+B7-H4^+$  MDSC и величине тумора као и броја позитивних лимфних чворова. Такође смо показали да се карциноми плућа различитог хистолошког типа драматично разликују по капацитету да индукују повећан број  $CD14^+B7-H4^+$  MDSC, што се може интерпретирати као различит имunosупресивни потенцијал. Утврдили смо да су узорци туморске микроциркулације лако доступни за анализу и да су значајнији од узорка периферне крви јер нуде сензитивније и информативније податке, прецизније рефлектујући локални баланс између туморског и имунског одговора.

MDSC су важне у прогресији тумора и избегавању имунског одговора. Оне су врло атрактивна терапијска мета, посебно зато што су присутне у периферној крви пацијената. Боље разумевање улоге MDSC у прогресији тумора било би важно за повећање ефикасности терапија заснованих на модулацији имунског одговора.

Сматрамо да су неопходна даља истраживања улоге, удела и подтипова *MDSC* код пацијената са различитим врстама карцинома плућа и да би то могло да допринесе значајно бољој терапији ових пацијената, а самим тим и бољем исходу лечења. Даља истраживања би несумњиво могла да допринесу осетно бољем укупном преживљавању пацијената, али и преживљавању без прогресије болести, односно без појаве рецидива болести.

## 6. ЗАКЉУЧАК

1. Учесталост  $CD14^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}B7H4^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}CD23^{+}$  MDSC и  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC је значајно већа код пацијената са карциномом плућа у поређењу са здравим контролним пацијентима.
2. Учесталост  $CD14^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}B7H4^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}CD23^{+}$  MDSC и  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC значајно је већа у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке крви истих пацијената.
3. У односу на хистолошки тип тумора, болесници са ситноћелијским карциномом, аденокарциномом и сквамозелуларним карциномом плућа имали су значајно веће вредности свих испитиваних популација MDSC из узорака микроциркулације тумора у односу на узорке из крви. Изузетак су болесници са крупноћелијским карциномом, код којих је проценат  $CD14^{+}$  MDSC и  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC већи у узорцима крви у односу на микроциркулацију тумора.
4. У узорцима микроциркулације тумора пацијената са великим туморима детектовали смо значајно већу учесталост  $CD14^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}B7H4^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}CD23^{+}$  MDSC и  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC у односу на њихове узорке крви. Код болесника са малим туморима ( $T1$ ,  $T2$ ) вредности  $CD14^{+}$  MDSC веће су у узорцима крви у односу на микроциркулацију тумора.
5. Учесталост  $CD14^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}B7H4^{+}$  MDSC,  $CD14^{+}CD23^{+}$  MDSC и  $CD23^{+}B7H4^{+}$  MDSC значајно је већа у узорцима микроциркулације тумора у односу на узорке крви истих пацијената свих  $N$  стадијума.

6. У обе врсте узорака пацијената без метастатске болести дететковали смо већу учесталост *CD14+ MDSC* и *CD14+B7H4+ MDSC* као и *CD14+CD23+ MDSC* у узорку микроциркулације тумора. Већа учесталост *CD14+CD23+ MDSC* у узорку крви као и *CD23+B7H4+MDSC* у обе врсте узорака је била код *M1* болести.
7. У оба клиничка стадијума (III и IV) детектовали смо већу учесталост *CD14+ MDSC*, *CD14+B7H4+ MDSC*, *CD14+CD23+ MDSC* и *CD23+B7H4+ MDSC* у узорцима микроциркулације тумора у односу на узорке крви истих пацијената. Проценат свих испитиваних популација *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора је већа у III клиничком стадијуму.



## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN 2018. Cancer fact sheets. Доступно на: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019; 144 (8): 1941-53.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58 (2): 71-96.
4. Rocco G, Morabito A, Leone A, Muto P, Fiore F, Budillon A. Management of non-small cell lung cancer in the era of personalized medicine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 78: 173-9.
5. Cancer.Net. Lung Cancer - Small Cell: Statistics. Доступно на: <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-small-cell/statistics>
6. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J Thorac Oncol*. 2010; 5 (1): 29-33.
7. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.

8. Tan WW, Huq S. Non-Small Cell Lung Cancer. Доступно на:  
<http://emedicine.medscape.com/article/279960-overview#a6>
9. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Lung and Bronchus Cancer. Доступно на: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
10. American Cancer Society. Lung Cancer Survival Rates. Доступно на:  
<https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
11. Милашиновић Г, уредник. Национални водич добре клиничке праксе: Карцином плућа. Београд: Републичка стручна комисија за израду и имплементацију водича добре клиничке праксе, Министарство здравља Републике Србије; 2012. Доступно на:  
<http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Decembar/Vodici/Vodic%20za%20dijagnosticovanje%20i%20lečenje%20karcinoma%20pluca.pdf>
12. Gridelli C, Ardizzoni A, Le Chevalier T, Manegold C, Perrone F, Thatcher N, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer patients with ECOG performance status 2: results of an European Experts Panel. *Ann Oncol*. 2004; 15 (3): 419-26.
13. Carmichael JA, Wing-San Mak D, O'Brien M. A Review of Recent Advances in the Treatment of Elderly and Poor Performance NSCLC. *Cancers (Basel)*. 2018; 10 (7): 236.
14. Wozniak AJ, Gadgeel SM. Clinical Presentation of Non-Small Cell Carcinoma of the Lung. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 291-303.
15. Patel AM, Peters SG. Clinical manifestations of lung cancer. *Mayo Clin Proc*. 1993; 68 (3): 273-7.

16. Patel AM, Davila DG, Peters SG. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Mayo Clin Proc.* 1993; 68 (3): 278-87.
17. Novello S, Asamura H, Bazan J, Carbone D, Goldstraw P, Grunenwald D, et al. Early stage lung cancer: progress in the last 40 years [corrected]. *J Thorac Oncol.* 2014; 9 (10): 1434-42.
18. Hanagiri T, Baba T, So T, Yasuda M, Sugaya M, Ono K, et al. Time trends of surgical outcome in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010; 5 (6): 825-9.
19. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group. *Lancet.* 1998; 352 (9124): 257-63.
20. Fosella FV. Docetaxel (DOC) for non-small lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer.* 1997;18 (Suppl. 2): 62.
21. Park SJ, More S, Murtuza A, Woodward BD, Husain H. New Targets in Non-Small Cell Lung Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017; 31 (1): 113-29.
22. Selesković H, Ajanović E, Grujić M. *Clinical Immunology.* Sarajevo: Svjetlost; 2007.
23. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Annu Rev Med.* 1988; 39: 63-73.
24. Abbas AK, Lichtman AH. *Osnovna imunologija funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema, drugo obnovljeno izdanje.* Beograd: Data Status; 2007.
25. Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Huang M, St John M, Lee JM et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells augments antitumor activity against lung cancer. *Immunotargets Ther.* 2012; 2012 (1): 7-12.

26. Stanojević I, Gačević M, Jović M, Mijušković Ž, Zečević R, Zolotarevski L, et al. Sniženje vrednosti supresorskih ćelija mijeloidnog porekla kod bolesnika sa melanomom indukovano interferonom alfa. *Vojnosanit Pregl.* 2015; 72 (4): 342-9.
27. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and molecular immunology* (7<sup>th</sup> ed). Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012; 389-405.
28. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest.* 2015; 125 (9): 3356-64.
29. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9 (3): 162-74.
30. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 2010; 185 (4): 2273-84.
31. Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 2006; 66 (18): 9299-307.
32. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (22): 3584-90.
33. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9 (4): 470–81.
34. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009; 182 (8): 4499-506.

35. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 253-68.
36. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59: 1593-600.
37. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2011; 32 (1): 19-25.
38. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2011; 32 (1): 19-25.
39. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*. 2005; 65 (8): 3044-8.
40. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, et al. Population alterations of L-arginase and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136 (1): 35-45.
41. Srivastava MK, Bosch JJ, Thompson JA, Ksander BR, Edelman MJ, Ostrand-Rosenberg S. Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57 (10): 1493-504.
42. Srivastava MK, Andersson Å, Zhu L, Harris-White M, Lee JM, Dubinett S, et al. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy*. 2012; 4 (3): 291-304.
43. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-

- dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 2010; 120 (2): 457-71.
44. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2009; 182 (9): 5693-701.
  45. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest.* 2013; 123 (4): 1580-9.
  46. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol.* 2002; 168 (2): 689-95.
  47. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010; 70 (1): 68-77.
  48. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8 T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007; 13 (7): 828-35.
  49. Nagaraj S, Collazo M, Corzo CA, Youn JI, Ortiz M, Quiceno D, et al. Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer Res.* 2009; 69 (19): 7503-6.
  50. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000; 101 (5): 455-8.
  51. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4 CD25 T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol.* 2006; 176 (3): 1582-7.

52. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol.* 2007; 179 (2): 977-83.
53. Gabrilovich D, Pisarev V. Tumor escape from immune response:-mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets.* 2003; 4 (7): 525-36.
54. Hammani I, Chen J, Murschel F, Bronte V, De Crescenzo G, Jolicoeur M. Immunosuppressive activity enhances central carbon metabolism and bioenergetics in myeloid-derived suppressor cells in vitro models. *BMC Cell Biol.* 2012; 13:18.
55. Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, et al. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood.* 2007; 109 (10): 4336-42.
56. Marin AV, Jiménez-Reinoso A, Briones AC, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus C, Pasick LJ, et al Primary T-cell immunodeficiency with functional revertant somatic mosaicism in CD247. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139 (1): 347-9.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.020.
57. Draghiciu O, Lubbers J, Nijman HW, Daemen T. Myeloid derived suppressor cells - An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncoimmunology.* 2015; 4 (1): e954829. doi: 10.4161/21624011.2014.954829.
58. Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol.* 2011; 89 (2): 311-7.
59. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4 (12): 941-52.

60. Young MR, Wright MA, Lozano Y, Prechel MM, Benefield J, Leonetti JP, et al. Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells. *Int J Cancer*. 1997; 74 (1): 69-74.
61. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9 (3): 162-74.
62. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008; 181 (8): 5791-802.
63. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*. 2008; 135 (1): 234-43.
64. Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kübler H, et al. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14 (24): 8270-8.
65. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58 (1): 49-59.
66. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*. 2007; 25 (18): 2546-53.



67. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* 2009; 69 (4): 1553-60.
68. Sevko A, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. *J Cancer.* 2013; 4 (1): 3-11.
69. Chioda M, Peranzoni E, Desantis G, Papalini F, Falisi E, Solito S, et al. Myeloid cell diversification and complexity: an old concept with new turns in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30 (1): 27-43.
70. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009; 182 (8): 4499-506.
71. Baniyash M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16 (1): 80-8.
72. Wilcox RA. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. *Mayo Clin Proc.* 2010; 85 (7): 656-63.
73. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30 (1): 83-95.
74. Meyer C, Sevko A, Ramacher M, Bazhin AV, Falk CS, Osen W, et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (41): 17111-6.

75. Haverkamp JM, Crist SA, Elzey BD, Cimen C, Ratliff TL. In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. *Eur J Immunol*. 2011; 41 (3): 749-59.
76. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2011; 32 (1): 19-25.
77. Chornoguz O, Grmai L, Sinha P, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S. Proteomic pathway analysis reveals inflammation increases myeloid-derived suppressor cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10 (3): M110.002980.
78. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol*. 2011; 33 (5): 441-54.
79. Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med (Berl)*. 2003; 81 (1): 20-31.
80. Söderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1176: 55-69.
81. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*. 2006; 176 (1): 284-90.
82. Ye XZ, Yu SC, Bian XW. Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *J Genet Genomics*. 2010; 37 (7): 423-30.

83. Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res*. 2006; 312 (2): 184-97.
84. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2008; 181 (7): 4666-75.
85. Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2010; 184 (6): 3106-16.
86. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, et al. IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol*. 2010; 40 (12): 3347-57.
87. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59 (10): 1593-600.
88. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5 (8): 641-54.
89. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*. 2008; 222: 180-91.
90. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008; 111 (8): 4233-44.

91. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008; 181 (8): 5791-802.
92. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol.* 2009; 182 (1): 240-9.
93. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell.* 2008; 13 (1): 23-35.
94. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006; 66 (2): 1123-31.
95. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010; 70 (1): 99-108.
96. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010; 70 (1): 68-77.
97. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med.* 2005; 202 (7): 931-9.
98. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (11): 798-809.

99. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol.* 2004; 172 (1): 464-74.
100. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* 2005; 65 (20): 9525-35.
101. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. Version 2. *J Clin Invest.* 2008; 118 (10): 3367-77.
102. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res.* 2010; 70 (11): 4335-45.
103. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res.* 2009; 69 (6): 2506-13.
104. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007; 81 (1): 28-37.
105. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2006; 116 (10): 2777-90.
106. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol.* 2005; 174 (8): 4880-91.

107. Ko JS, Rayman P, Ireland J, Swaidani S, Li G, Bunting KD, et al. Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res.* 2010; 70 (9): 3526-36.
108. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol.* 2005; 174 (2): 636-45.
109. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res.* 2005; 65 (24): 11743-51.
110. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 2003; 198 (11): 1741-52.
111. Munera V, Popovic PJ, Bryk J, Pribis J, Caba D, Matta BM, et al. Stat 6-dependent induction of myeloid derived suppressor cells after physical injury regulates nitric oxide response to endotoxin. *Ann Surg.* 2010; 251 (1): 120-6.
112. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011; 32 (1): 19-25.
113. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62 (9): 1439-51.
114. Feng PH, Lee KY, Chang YL, Chan YF, Kuo LW, Lin TY, et al. CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical

- relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186 (10): 1025-36.
115. Vetsika EK, Koinis F, Gioulbasani M, Aggouraki D, Koutoulaki A, Skalidaki E, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res*. 2014; 2014: 659294.
  116. Heuvers ME, Muskens F, Bezemer K, Lambers M, Dingemans AM, Groen HJ, et al. Arginase-1 mRNA expression correlates with myeloid-derived suppressor cell levels in peripheral blood of NSCLC patients. *Lung Cancer*. 2013; 81 (3): 468-74.
  117. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136 (1): 35-45.
  118. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 62 (9): 1439-51.
  119. Tian T, Gu X, Zhang B, Liu Y, Yuan C, Shao L, et al. Increased circulating CD14(+)HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells are associated with poor prognosis in patients with small-cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15 (4): 425-32.
  120. Zhang G, Huang H, Zhu Y, Yu G, Gao X, Xu Y, et al. A novel subset of B7-H3<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells are associated with progression of human NSCLC. *Oncoimmunology*. 2015; 4 (2): e977164.

121. Yang Z, Guo J, Weng L, Tang W, Jin S, Ma W. Myeloid-derived suppressor cells- new and exciting players in lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2020; 13 (1): 10.
122. Seliger B, Quandt D. The expression, function, and clinical relevance of B7 family members in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61 (8): 1327-41.
123. Leung J, Suh WK. The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune Netw.* 2014; 14 (6): 265-76.
124. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol.* 2001; 2 (3): 269-74.
125. Suh WK, Wang S, Duncan GS, Miyazaki Y, Cates E, Walker T, et al. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7x-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2006; 26 (17): 6403-11.
126. Zhu G, Augustine MM, Azuma T, Luo L, Yao S, Anand S, et al. B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity. *Blood.* 2009; 113 (8): 1759-67.
127. Zang X, Loke P, Kim J, Murphy K, Waitz R, Allison JP. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (18): 10388-92.
128. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (49): 19458-63.
129. Quandt D, Fiedler E, Boettcher D, Marsch WCh, Seliger B. B7-h4 expression in human melanoma: its association with patients' survival and antitumor immune response. *Clin Cancer Res.* 2011; 17 (10): 3100-11.



130. Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, Hagihara T, Yanagita S, Ishigami S, et al. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis. *J Surg Oncol*. 2010; 102 (7): 748-52.
131. Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 53 (2): 143-51.
132. Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe JD, et al. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102 (1): 26-38.
133. Oikonomopoulou K, Li L, Zheng Y, Simon I, Wolfert RL, Valik D, et al. Prediction of ovarian cancer prognosis and response to chemotherapy by a serum-based multiparametric biomarker panel. *Br J Cancer*. 2008; 99 (7): 1103-13.
134. Simon I, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, Scorilas A, Kim NW, et al. B7-H4 is over-expressed in early-stage ovarian cancer and is independent of CA125 expression. *Gynecol Oncol*. 2007; 106 (2): 334-41.
135. Simon I, Liu Y, Krall KL, Urban N, Wolfert RL, Kim NW, et al. Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2007; 106 (1): 112-8.
136. Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, et al. B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res*. 2006; 66 (3): 1570-5.
137. Thompson RH, Zang X, Lohse CM, Leibovich BC, Slovin SF, Reuter VE, et al. Serum-soluble B7x is elevated in renal cell carcinoma patients and is associated with advanced stage. *Cancer Res*. 2008; 68 (15): 6054-8.
138. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014; 289 (51): 35237-45.

139. Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, Kang JI, Jung HE, Lee D, et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*. 2017; 46 (1): 38-50.
140. Chun KH, Seong SY. CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP. *Int Immunopharmacol*. 2010; 10 (1): 98-106.
141. Roedig H, Nastase MV, Frey H, Moreth K, Zeng-Brouwers J, Poluzzi C, et al. Biglycan is a new high-affinity ligand for CD14 in macrophages. *Matrix Biol*. 2019; 77: 4-22. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.006.
142. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- $\alpha$ . *Eur J Immunol*. 2002; 32 (2): 404-12.
143. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17 (9): 559-72.
144. DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A, et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer*. 2002; 94 (6): 1721-30.
145. Dadmarz R, Cawley JC. Heterogeneity of CLL: high CD23 antigen and  $\alpha$ IFN receptor expression are features of favorable disease and of cell activation. *Br J Haematol*. 1998; 68 (3): 279-82.
146. Lavabre-Bertrand T, Exbrayat C, Bourquard P, Lavabre-Bertrand C, Fégueux N, Poncelet P, et al. CD23 antigen density is related to serum gamma globulin level, bone marrow reticulin pattern, and treatment in B chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1994; 13 (1-2): 89-94.

147. Acharya M, Borland G, Edkins AL, Maclellan LM, Matheson J, Ozanne BW, et al. CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162 (1): 12-23.
148. Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, et al. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10 (24): 8363-70.
149. Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0164514. doi: 10.1371/journal.pone.0164514.
150. Koinis F, Vetsika EK, Aggouraki D, Skolidaki E, Koutoulaki A, Gkioulmpasani M, et al. Effect of First-Line Treatment on Myeloid-Derived Suppressor Cells' Subpopulations in the Peripheral Blood of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016; 11 (8): 1263-72.
151. Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, et al. CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-β-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2017; 6 (6): e1320011. doi: 10.1080/2162402X.2017.1320011.
152. Deng Z, Rong Y, Teng Y, Zhuang X, Samykutty A, Mu J, et al. Exosomes miR-126a released from MDSC induced by DOX treatment promotes lung metastasis. *Oncogene*. 2017; 36 (5): 639-51.
153. Srivastava MK, Dubinett S, Sharma S. Targeting MDSCs enhance therapeutic vaccination responses against lung cancer. *Oncoimmunology*. 2012; 1 (9): 1650-1.
154. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9 (4): 470-81.

155. Nefedova Y, Fishman M, Sherman S, Wang X, Beg AA, Gabrilovich DI. Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007; 67 (22): 11021-8.
156. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, et al. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood.* 2008; 111 (1): 219-28.
157. Gao P, Zhang H, Dinavahi R, Li F, Xiang Y, Raman V, et al. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell.* 2007; 12 (3): 230-8.
158. Stanojevic I, Miller K, Kandolf-Sekulovic L, Mijuskovic Z, Zolotarevski L, Jovic M, et al. A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma. *Int Immunol.* 2016; 28 (2): 87-97.
159. Chen Y, Pan G, Tian D, Zhang Y, Li T. Functional analysis of CD14+HLA-DR<sup>-</sup>/low myeloid-derived suppressor cells in patients with lung squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017; 14 (1): 49-354.
160. Liu J, Zhou Y, Huang Q, Qiu L. CD14+HLA-DR<sup>low/-</sup> expression: A novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett.* 2015; 9 (3): 1167-72.
161. Shi G, Wang H, Zhuang X. Myeloid-derived suppressor cells enhance the expression of melanoma-associated antigen A4 in a Lewis lung cancer murine model. *Oncol Lett.* 2016; 11 (1): 809-16.
162. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR<sup>(-/low)</sup> myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62 (9): 1439-51.

163. Qian Y, Shen L, Cheng L, Wu Z, Yao H. B7-H4 expression in various tumors determined using a novel developed monoclonal antibody. *Clin Exp Med*. 2011; 11 (3): 163-70.
164. Choi IH, Zhu G, Sica GL, Strome SE, Cheville JC, Lau JS, et al. Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. *J Immunol*. 2003; 171 (9): 4650-4.
165. Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, Joshi S, Cheng Y, Sandaltzopoulos R, et al. Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses. *Cancer Res*. 2013; 73 (15): 4820-9.
166. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, et al. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*. 2006; 177 (1): 40-4.
167. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med*. 2006; 203 (4): 871-81.
168. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2007; 67 (18): 8900-5.
169. Matsunaga T, Saito H, Ikeguchi M. Increased B7-H1 and B7-H4 Expressions on Circulating Monocytes and Tumor-Associated Macrophages are Involved in Immune Evasion in Patients with Gastric Cancer. *Yonago Acta Med*. 2011; 54 (1): 1-10.
170. Tan Z, Shen W. Prognostic role of B7-H4 in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8 (16): 27137-44.

171. Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel PA, Enk AH, Ring S et al. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment J Thorac Oncol. 2011; 6 (7): 1162-8. doi: 10.1097/JTO.0b013e31821c421d.
172. Hamilton G, Rath B, Klameth L, Hochmair MJ. Small cell lung cancer: Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. Oncoimmunology. 2015 Oct 29; 5 (2016) Mar. doi: 10.1080/2162402X.2015.1093277
173. Feng PH, Yu CT, Chen KY, Luo CS, Wu SM, Liu CY, et al. S100A9+ MDSC and TAM-mediated EGFR-TKI resistance in lung adenocarcinoma: the role of RELB. Oncotarget. 2018; 9 (7): 7631-43.
174. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, Rathinasamy A, Umansky L, Juenger S, et al. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. Am J Respir Crit Care Med. 2018; 198 (6): 777-87.
175. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, Rathinasamy A, Umansky L, Juenger S, et al. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. Am J Respir Crit Care Med. 2018; 198 (6): 777-87.
176. Karlicic V, Vukovic J, Stanojevic I, Sotirovic J, Peric A, Jovic M, et al. Association of locally produced IL10 and TGFb1 with tumor size, histological type and presence of metastases in patients with lung carcinoma. J BUON. 2016; 21 (5): 1210-8.
177. González-Santiago AE, Mendoza-Topete LA, Sánchez- Llamas F, Troyo-Sanromán R, Gurrola-Díaz CM. TGF- $\beta$ 1 serum concentration as a complementary diagnostic biomarker of lung cancer: establishment of a cut-point value. J Clin Lab Anal 2011; 25: 238-243.

178. Jakowlew BS. Transforming Growth Factor- $\beta$  in Lung Cancer, Carcinogenesis, and Metastasis, Chapter 28, pp 633-671. In: Rebecca G. Bagley (Ed): The Tumor Microenvironment, Springer, New York, 2010.
179. Jarnicki GA, Lysaght J, Todryk S, Mills HGK. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF-Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4 and CD8 Regulatory T Cells. *J Immunol* 2006; 177: 896- 904.
180. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*. 1998; 77 (1): 7-12.
181. Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X, et al. Type Two Cytokines Predominance of Human Lung Cancer and Its Reverse by Traditional Chinese Medicine TTMP. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1:63-70.
182. Ghayumi MA, Mojtahedi Z, Fattahi MJ. Th1 and Th2 Cytokine Profiles in Malignant Pleural Effusion. *Iran J Immunol* 2011; 8 (4), 195-200. doi: IJlv8i4A1
183. Li R, Ruttinger D, Li R, Si LS, Wang YL. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2003; 388 (6) 406–412. doi:10.1007/s00423-003-0416-0.
184. Ma J, Liu H, Wang X. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer. *J Tradit Chin Med* 2014; 34 (6): 641-645. doi:10.1016/s0254-6272(15)30076-5.
185. Hodge G, Barnawi J, Jurisevic C, Moffat D, Holmes M, Reynolds PN et al. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- $\gamma$  by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clin Exp Immunol*. 2014; 178 (1): 79-85. doi: 10.1111/cei.12392.

186. Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z, et al. M2-Polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymph angiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics* 2011; 66 (11): 1879-1886. doi:10.1590/s1807-59322011001100006
187. Ito N, Nakamura H, Metsugi H and Ohgi S. Dissociation between T helper type 1 / type 2 differentiation and cytokine production of tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer patients. *Surg Today*. 2001; 31 (5): 390-4. doi:10.1007/s005950170127.
188. Ito N, Suzuki Y, Taniguchi Y, Ishiguro K, Nakamura H, Ohgi S. Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2005; 25(3B): 2027-31.
189. Huang M, Wang J, Lee P, Stiantila S, Mao JT, Meissner H et al.  
Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Express a Type 2 Cytokine Pattern.  
*Cancer Research* 1995; 55: 3847-3853.
190. Fujisawa T, Joshi BH, Puri RK IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13R $\alpha$ 2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2012; 131 (2): 344-56. doi: 10.1002/ijc.26366.
191. Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK. A Novel Role of Interleukin-13 Receptor  $\alpha$ 2 in Pancreatic Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res* 2009; 69 (22): 8678–85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2100.
192. Vuković J, Nikolić N, Karličić V, Stanojević I, Supić G, Jović M, et al. High number of CD14+B7H4+ monocytes is significantly associated with increased IL-4, IL-13, IL-10 and TGF- $\beta$  in carcinoma. *Vojnosanitetski pregled* 2020 OnLine-First Issue 00, Pages: 43-43 <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.2298/VSP200229043V>
193. Karlicic V, Vukovic J, Stanojević I, Sotirovic J, Peric A, Jović M, et al. IL-27 Concentration in Systemic Circulation and Tumor Micro-Circulation Samples of



- Scic and Nscic Patients; Association with Tumor Size, Histological Type and Presence of Metastases. *Austin J Clin Immunol*. 2016; 3 (1): 1030.
194. Pogoda K, Pyszniak M, Rybojad P, Tabarkiewicz J. Monocytic myeloid-derived suppressor cells as a potent suppressor of tumor immunity in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2016; 12 (6): 4785–94. doi: 10.3892/ol.2016.5273
195. Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*. 2003; 18 (6): 849-61.
196. Shi H, Ji M, Wu J, Zhou Q, Li X, Li Z, et al. Serum B7-H4 expression is a significant prognostic indicator for patients with gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2014; 12: 188.
197. Chen Y, Sun J, Zhao H, Zhu D, Zhi Q, Song S, et al. The coexpression and clinical significance of costimulatory molecules B7-H1, B7-H3, and B7-H4 in human pancreatic cancer. *Onco Targets Ther*. 2014; 7: 1465-72.
198. Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity*. 2003; 18 (6): 863-73.
199. Yi KH, Chen L. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev*. 2009; 229 (1): 145-51.
200. Wang L, Heng X, Lu Y, Cai Z, Yi Q, Che F. Could B7-H4 serve as a target to activate anti-cancer immunity? *Int Immunopharmacol*. 2016; 38: 97-103.
201. Milette S, Fiset PO, Walsh LA, Spicer JD, Quail DF. The innate immune architecture of lung tumors and its implication in disease progression. *J Pathol*. 2019; 247 (5): 589-605.

202. Adah D, Hussain M, Qin L, Qin L, Zhang J, Chen X. Implications of MDSCs-targeting in lung cancer chemo-immunotherapeutics. *Pharmacol Res.* 2016; 110: 25-34.
203. Tavakkoli M, Wilkins CR, Mones JV, Mauro MJ. A Novel Paradigm Between Leukocytosis, G-CSF Secretion, Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Myeloid-Derived Suppressor Cells, and Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2019; 9: 295. doi: 10.3389/fonc.2019.00295.
204. Ortiz ML, Lu L, Ramachandran I, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2 (1): 50-8.
205. Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Kar UK, Huang M, Johnson MF, et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e40677.
206. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother.* 2016; 65 (2): 161-9.
207. Zhou Q, Tang X, Tian X, Tian J, Zhang Y, Ma J, et al. LncRNA MALAT1 negatively regulates MDSCs in patients with lung cancer. *J Cancer.* 2018; 9 (14): 2436-42.
208. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136 (1): 35-45.

209. Limagne E, Richard C, Thibaudin M, Fumet JD, Truntzer C, Lagrange A, et al. Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (4): e1564505.
210. Navarro-Martin A, Galiana IL, Berenguer Frances MA, Cacicedo J, Canas Cortes R, et al. Preliminary study of the effect of stereotactic body radiotherapy (SBRT) on the immune system in lung cancer patients unfit for surgery: immunophenotyping analysis. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (12). doi: [org/10.3390/ijms19123963](https://doi.org/10.3390/ijms19123963).